

Aus dem Institut für Humangenetik der Universität Marburg
Direktor: Professor Dr. G. G. Wendt

PRIMÄRE DYSBETALIPOPROTEINÄMIE:
DIAGNOSE OHNE ULTRAZENTRIFUGATION, GENHÄUFIGKEIT, GENETIK

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät der
Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
Michael Hees
aus Rothemühle

Marburg 1977



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552327_0110

Aus dem Institut für Humangenetik der Universität Marburg
Direktor: Professor Dr. G. G. Wendt

PRIMÄRE DYSBETALIPOPROTEINÄMIE:
DIAGNOSE OHNE ULTRAZENTRIFUGATION, GENHÄUFIGKEIT, GENETIK

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät der
Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
Michael Hees
aus Rothemühle

Marburg 1977



Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Marburg am

Gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Dekan: Prof. Dr. F. Neurath

Referent: Dr. med. habil. G. Utermann

Correferent: Prof. Dr. G. G. Wendt

INHALTSVERZEICHNIS

	<u>Seite</u>
I Einleitung	1
1. Lipoproteine	
2. Hyperlipoproteinämien	
3. Hyperlipoproteinämie Typ III (Primäre Dysbetalipoproteinämie)	
II Fragestellung	10
III Material und Methoden	11
IV Ergebnisse	
1. Eine einfache Methode zur Diagnose der Hyperlipoproteinämie Typ III: Nachweis der Apoprotein E-Phänotypen ohne Ultrazentrifugation	15
2. Konstanz der Apo E-Phänotypen unter unterschiedlichen metabolischen Bedingungen	19
3. Häufigkeit der Apo E-Phänotypen in einer deutschen Bevölkerungsprobe	22
4. Phänotyp Apo E-D und das Auftreten von Dysbetalipoproteinämie	27
5. Häufigkeit der Apo E-Phänotypen und der Hyperlipoproteinämie Typ III in einer hyperlipämischen Population	30
6. Häufigkeit der Apo E-IV-Variante	36
7. Familienuntersuchung	39
V Diskussion	45
VI Zusammenfassung	51
Schrifttumsverzeichnis	53

I EINLEITUNG

1. Lipoproteine

Mit Ausnahme der freien Fettsäuren und des Lysolecithins ist alles Plasmafett Bestandteil definierter hochmolekularer Fett-Eiweißkomplexe, die als Lipoproteine bezeichnet werden. Als Transportvehikel besitzen die Lipoproteine eine Schlüsselfunktion im Stoffwechsel der Nahrungs- und Körperdepotfette. Ihre physikochemischen Eigenschaften gestatten eine Differenzierung in verschiedene Fraktionen mit Hilfe der Lipoproteinelektrophorese, der Ultrazentrifugation und immunologischer Methoden. Heute ist die Unterteilung der Lipoproteine mittels Ultrazentrifugation in 4 Dichteklassen üblich: 1. Chylomikronen mit einer Dichte von $d = 0,900 - 0,940$ g/ml, 2. Very Low Density Lipoproteine (VLDL) mit $d = 0,940 - 1,006$ g/ml, 3. Low Density Lipoproteine (LDL mit 2 Unterklassen LDL-1 und LDL-2) mit $d = 1,006 - 1,063$ g/ml und 4. High Density Lipoproteine (HDL mit 2 Unterklassen HDL-2 und HDL-3) mit $d = 1,063 - 1,210$ g/ml. Alle Plasmalipoproteine enthalten die 4 Komponenten Protein, Cholesterin, Triglyceride und Phospholipide - allerdings in verschiedenen Konzentrationsverhältnissen.

Die Eiweißbestandteile der Lipoproteine des Plasmas werden als Apoproteine bezeichnet. Bisher sind 5 Gruppen von Apoproteinen bekannt: Apo A, B, C, D und E.

Die Chylomikronen als die Fraktion mit der geringsten Dichte und dem größten Lipidanteil dienen der Aufnahme und dem Transport der Nahrungstriglyceride; im Nüchternplasma des Stoffwechselgesunden kommen sie daher nicht vor. Ihre Größe schwankt zwischen $1000 \text{ \AA}$ und $10000 \text{ \AA}$. Ihre Struktur ist gekennzeichnet durch einen Kern aus Triglyceriden und Cholesterinestern, der von einem membranartigen Mantel aus Proteinen, Phospholipiden und Cholesterin umschlossen ist. Sie haben eine Proteinlipidzusammensetzung von 85-95% Triglyceride, 5-10% Phospholipide, 3-5% Cholesterin und 1-3% Apoproteine (20% Apo B, 70% Apo C und je 3-5% Apo A-I und A-II) (33). Bei der elektrophoretischen Trennung bleiben

die Chylomikronen an der Auftragsstelle liegen.

Die VLDL, die in der Leber synthetisiert werden, transportieren die endogenen Triglyceride. Die Größe der VLDL-Partikel liegt im Bereich zwischen 300 Å und 800 Å. Sie zeigen Prä- β -Mobilität in der Elektrophorese und enthalten etwa 60-70% Triglyceride, je 10-15% Phospholipide und Cholesterin und 10% Protein; ihre Apoproteinzusammensetzung lautet: 40% Apo B, 50% Apo C und 10-15% argininreiches Apo E (50).

Die LDL, die wahrscheinlich das Endprodukt im Katabolismus der VLDL darstellen, machen 40-50% der Plasmalipoproteine aus. Sie sind 200 - 250 Å groß und enthalten die Hauptfraktion des Transport-Cholesterins. Sie haben eine Proteinlipidzusammensetzung von 45% Cholesterin, 25% Protein, 20-30% Phospholipide und 5-10% Triglyceride. Mehr als 95% des gesamten Proteins besteht aus Apo B, zusätzlich sind Spuren von Apo C vorhanden (35). Im elektrophoretischen Feld wandern die LDL mit den β -Globulinen.

Die HDL mit einer Größe von 75 - 150 Å haben enge Beziehungen zum Cholesterinstoffwechsel. Ihr Gehalt an Cholesterin beträgt 20%, an Phospholipiden 30%, an Proteinen 50%, von denen Apo A-I und Apo A-II 90-95% und die 3 Polypeptide der C-Gruppe (C-I, C-II, C-III) 5-10% ausmachen; Triglyceride sind in den HDL kaum zu finden (9). In der Elektrophorese zeigen die HDL α_1 -Mobilität.

2. Hyperlipoproteinämien

Die Störungen des Lipidstoffwechsels haben an praktischer Bedeutung gewonnen, seitdem bekannt ist, daß die Hypercholesterinämie und Hypertriglyceridämie das Risiko einer Koronarschädigung bzw. eines Herzinfarktes erheblich vergrößern. Außer den Hyperlipoproteinämien werden auch Fettspeicherkrankheiten und Hypo- oder Alipoproteinämien zum Formenkreis der Fettstoffwechselstörungen gezählt.

Als Hyperlipoproteinämie wird die Zunahme einer oder mehrerer Blutfettfraktionen über einen physiologischen Grenzbe-

reich hinaus bezeichnet. Üblicherweise wird zwischen sekundären und primären Formen, die sich zumeist in ihrem Erscheinungsbild sehr ähneln, unterschieden. Bei den häufigeren sekundären Hyperlipoproteinämien handelt es sich um diejenigen Störungen, die in Begleitung einer Grundkrankheit auftreten, welche nicht selbst eine Störung des Fettstoffwechsels darstellt. Bei den sekundären Formen werden nicht nur Vermehrungen von Einzelfractionen der Blutlipide beobachtet, sondern es treten auch abweichende Lipoproteine auf, z.B. LP-X bei Cholestase (47) oder ein abnormes HDL bei Hyperthyreose (60). Die sekundären Hyperlipoproteinämien werden im allgemeinen durch Beseitigung des Grundleidens geheilt.

Unter der Bezeichnung "Primäre Hyperlipoproteinämien" werden alle diejenigen Krankheitsformen zusammengefaßt, für welche eine genetische Ursache oder eine exogene Ursache mit unbekanntem Auslösungsmechanismus in Frage kommt. Die Klassifizierung der primären Formen entsprechend der Einteilung von FREDRICKSON und Mitarb. in 5 verschiedene Typen stützt sich vor allem auf das Verteilungsmuster der Lipoproteine bei der Elektrophorese (12). FREDRICKSON selbst hat diese Typeneinteilung als eine vorläufige Lösung bezeichnet, die die komplizierte Nomenklatur vereinfachen sollte (14). Ziel aber bleibt es, die verschiedenen Hyperlipoproteinämieformen nicht aufgrund ihrer Symptomatik, zu der auch das Lipoproteinmuster gehört, sondern aufgrund ihrer kausalen metabolischen Defekte zu differenzieren.

3. Hyperlipoproteinämie Typ III (Primäre Dysbetalipoproteinämie)

a) Definition und Diagnose

Die familiäre Hyperlipoproteinämie Typ III, auch als Broad- β Disease, Xanthoma tuberosum oder primäre Dysbetalipoproteinämie bezeichnet, ist eine erbliche Fettstoffwechselstörung mit einer erhöhten Konzentration von Cholesterin und Triglyceriden im Plasma. Sie ist charakterisiert durch das Auftreten eines atypischen Lipoproteins, das, obwohl es zu

der Fraktion der VLDL gehört, die elektrophoretische Mobilität von β -Lipoproteinen besitzt (14).

Die Diagnose "Hyperlipoproteinämie Typ III" sollte in Erwägung gezogen werden, falls 1. Cholesterin und Triglyceride erhöht sind und ihre Konzentrationsspiegel wöchentlich Schwankungen unterliegen, 2. Xanthoma striatum palmare auftritt und 3. eine Kombination von peripheren Durchblutungsstörungen, Hypertriglyceridämie und Diabetes mellitus besteht.

Die Definition und folglich auch die Diagnose der Hyperlipoproteinämie (HLP) Typ III sind uneinheitlich und wurden während der letzten Jahre wiederholt geändert, wie der anschließende Überblick veranschaulichen soll. 1954 beschrieben GOFMAN und Mitarb. bei Patienten mit Hyperlipidämie und tuberösen Xanthomen gemäß Beobachtungen in der analytischen Ultrazentrifuge eine Vermehrung der den VLDL und LDL-1 und eine Erniedrigung der den LDL-2 entsprechenden Lipoproteindichteklassen (19). 1965 unterschieden FREDRICKSON und LEES aufgrund des Elektrophoresemusters 5 verschiedene Hyperlipämie-Typen (10). Als HLP Typ III wurde zunächst ein Muster benannt, das durch eine Vermehrung der β - und Prä- β -Lipoproteine gekennzeichnet war (11). Diese Definition gilt jedoch seit 1970 für die HLP Typ II b (2). 1967 bezeichneten FREDRICKSON und Mitarb. eine breite β -Bande in der Lipoproteinelektrophorese und ein Lipoprotein in den VLDL mit β -Mobilität ("floating β ") als für den Typ III charakteristisch (12). Die Gültigkeit des β -VLDL-Merkmals wurde in letzter Zeit jedoch wiederholt in Frage gestellt (15,28); statt dessen wurden lipidchemische Kriterien für die Definition der HLP Typ III vorgeschlagen: 1. ein Verhältnis von VLDL-Cholesterin zu VLDL-Triglyceriden von mehr als 0,42 (26) und 2. ein Verhältnis von VLDL-Cholesterin zu Plasma-Triglyceriden über 0,30 für Seren mit Triglyceridkonzentrationen zwischen 150 mg/100 ml und 1000 mg/100 ml (15,39).

Die Diagnose der HLP Typ III gemäß diesen Definitionen mußte jedoch wegen der erforderlichen Ultrazentrifugation

auf wenige spezialisierte Laboratorien beschränkt bleiben. Aus diesem Grund wurden in der Vergangenheit mehrere Versuche unternommen, solche Methoden zur Diagnose der HLP Typ III zu entwickeln, die eine Ultrazentrifugation nicht mit einschließen: 1. MASKET und Mitarb. schlugen die gleichzeitige Elektrophorese von Plasma in Polyacrylamidgel und Papier bzw. Agarosegel vor (36). Bei der Hyperlipoproteinämie Typ III finden sich keine Lipoproteine in β -Position im Polyacrylamidgel, jedoch auf Papier und Agarosegel. In etwa 90% soll diese kombinierte Elektrophoresemethode eine Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Ultrazentrifugation ergeben. 2. WIELAND und SEIDEL gelang der Nachweis der β -VLDL nach vorheriger Lipoproteinelektrophorese auf Agarosegel durch schrittweise Präzipitation mittels Polyanionen (61). 3. Eine Möglichkeit zur immunologischen Diagnostik sahen SEIDEL und GRETEN im Auftreten von für Apo-VLDL spezifischen Immunopräzipitationslinien im β -Lipoproteinbereich im Plasma vom Typ III-Patienten (48). 4. Die analytische isoelektrische Fokussierung nativer Lipoproteine erbrachte als charakteristischen Hinweis für die HLP Typ III eine auffallende dichte Bande mit einem isoelektrischen Punkt von 5,44 (18). 5. SHEPHERD und Mitarb. wiesen auf die Agarose-Säulenchromatographie als geeignete Methode hin, mit deren Hilfe 3 nur für die HLP Typ III spezifische Elutionsmuster beobachtet werden können (49). Alle diese 5 genannten Methoden müssen aber, da sie im Prinzip auf der Darstellung des unzuverlässigen β -VLDL-Merkmals beruhen, als unspezifisch angesehen werden.

UTERMANN und Mitarb. beobachteten 1975 bei Patienten mit HLP Typ III das Fehlen einer der polymorphen Formen des Apoproteins E (Apo E-III) in den VLDL und LDL-1, womit der Nachweis eines spezifischen Merkmals für diese Erkrankung gelungen war (51). Zur Darstellung des Apo E-Musters wurde zunächst die Apo-VLDL mittels Ultrazentrifugation aus dem Serum isoliert und anschließend isoelektrisch fokussiert.

b. Pathophysiologie

In Stoffwechselgesunden werden die triglyceridreichen VLDL

in einem kontinuierlichen Prozeß zu LDL abgebaut (9). Der Katabolismus der VLDL wird durch die extrahepatische Lipoproteinlipase eingeleitet; die VLDL-Partikel verlieren einen Großteil ihrer Triglyceride und geben gleichzeitig einige ihrer Proteinkomponenten (Apo C) an die HDL ab (7,8). Intermediäre Lipoproteine oder "remnants", welche während dieses Prozesses entstehen, werden normalerweise schnell zu LDL-2 umgewandelt. Über den Abbau dieser "remnants" ist bisher nur wenig bekannt; vermutlich ist die Leberlipase an der Bildung der LDL-2 aus den "remnants" beteiligt (21). Während das gesamte Apo B in den Partikeln erhalten bleibt, werden die Apoproteine C und E aus ihnen entfernt. Das Endprodukt LDL-2 enthält somit fast ausschließlich Apo B und ist reich an Cholesterinestern (9).

Biochemisch ist die Hyperlipoproteinämie Typ III durch das Auftreten atypischer Lipoproteine in den VLDL und LDL-1 charakterisiert (13), welche in der Elektrophorese β - statt der gewöhnlichen Prä- β -Mobilität zeigen (14). Diese atypischen Lipoproteine sind reich an Cholesterin und arm an Triglyceriden (44) und enthalten viel argininreiches Apolipoprotein (Apo E) (24). Sie werden als intermediäre Lipoproteine oder "remnants" im Katabolismus von VLDL zu LDL angesehen. Wegen eines Defektes in ihrem weiteren katabolischen Umbau zu LDL-2 häufen sich diese cholesterinreichen "remnants" bei der HLP Typ III an (3,25,28,30). Bei Typ III-Patienten wiesen HAZZARD und BIERMAN kürzlich einen verzögerten Abbau triglyceridreicher Lipoproteine und eine verminderte Aufnahme sterolreicher "remnants" durch die Leber nach. Hieraus schlossen sie, daß der HLP Typ III eher ein funktioneller Defekt in der Assimilation der VLDL als eine strukturelle Abnormalität der VLDL-Apolipoproteine zugrunde liegt (30).

In den VLDL aus Typ III-Plasma wurden dieselben Apoproteine gefunden wie in normalen VLDL: Apo B, Apo C und argininreiches Apo E. Das argininreiche Apo E ist in den VLDL von Typ III-Patienten aber deutlich vermehrt (24,51). Es fehlt

jedoch eine der polymorphen Formen dieses Apoproteins (Apo E-III) (51,55). Vermutlich ist ein Defekt in der Regulation oder Struktur des Apo E-III für die HLP Typ III verantwortlich (51).

c) Klinik

Die Hyperlipoproteinämie vom Typ III kommt relativ selten vor; ihre Häufigkeit wird auf 1 : 4000 bis 1 : 10000 in der Bevölkerung geschätzt (12,20,29,32,46). Meistens wird die Erkrankung erst im Erwachsenenalter ausgebildet (4,38,40), bei männlichen Patienten im allgemeinen etwa 10 Jahre früher als bei weiblichen (4,40,42). Sie wurde aber auch bei einem erst 10 Jahre alten Jungen (17) und weiteren 6 Jugendlichen im Alter von 15 bis 19 Jahren beobachtet (16,27,34,39).

Als Erstmanifestationen spielen Xanthome und Durchblutungsstörungen, die meistens erst zur Suche nach einer Fettstoffwechselstörung Anlaß geben, eine besondere Rolle (14,40). Tuberöse Xanthome bestehen aus gelblichen Effloreszenzen, welche an den Streckseiten der Ellenbogen und Knie, am Gesäß, an den Knöcheln und Handinnenflächen zu finden sind. Die für die HLP Typ III charakteristische Hautveränderung aber sind die als Xanthoma planum oder Xanthoma striatum palmare bezeichneten gelblichen Effloreszenzen in den Falten der Handinnenflächen und an den volaren Fingergelenken (43). Sie finden sich nur selten bei anderen primären Hyperlipoproteinämien und sollen bei etwa 70% der Typ III-Patienten vorkommen (4,12,31,38,40,59). Frühzeitige Arteriosklerose mit ihren klinischen Komplikationen ist mit der HLP Typ III eng verknüpft. Im Vergleich mit anderen primären Hyperlipoproteinämien kommt den peripheren Durchblutungsstörungen bei der Typ III-HLP eine größere Bedeutung zu (4,31,38,40). Etwa 10% der Typ III-Patienten haben zerebrovaskuläre Komplikationen (40). Hyperurikämie wird bei Typ III-Patienten häufig gefunden, etwa zwischen 33% (4) und 43% (40). Ungefähr 55% der Patienten weisen eine pathologische Glukosetoleranz auf (40).

d) Genetik

Die Hyperlipoproteinämie Typ III tritt familiär auf. In der Vergangenheit wurden verschiedene Hypothesen für den Vererbungsmodus dieser Erkrankung aufgestellt: 1. autosomal rezessiv (14), 2. autosomal dominant (29,40), 3. gemischt heterozygot für 2 autosomale Gene (14,29) und 4. polygen (41). Aber erst mit der Entdeckung des Apo E-III-Defektes war ein wirksames Nachweisverfahren für genetische Studien gefunden worden (51). Die bisher durchgeführten Familienuntersuchungen lassen auf einen autosomal rezessiven Erbgang schließen (51). 3 verschiedene Phänotypen können aufgrund der Verteilung der 3 polymorphen E-Apoproteine beschrieben werden (52): 1. Den Individuen mit HLP Typ III fehlt das Apoprotein E-III bei einer gleichzeitigen Vermehrung des Apoproteins E-II. 2. Die meisten Individuen zeigen ein Apo E-Muster mit einer charakteristischen Verteilung der drei E-Apoproteine von etwa 2:1:2 (E-I:E-II:E-III). 3. Einige Individuen zeichnen sich durch ein "intermediäres" Apo E-Muster mit einem Verhältnis von E-II:E-III in der Größenordnung von etwa 1:1 aus; dieses "intermediäre" Muster liegt quantitativ zwischen dem normalen und demjenigen Muster mit der Apo E-III-Defizienz. Die Träger des "intermediären" Apo E-Musters werden als die heterozygoten Individuen der HLP Typ III angesehen (52).

e) Therapie

Die Behandlung zielt auf eine dauerhafte Senkung der Plasmalipide Cholesterin und Triglyceride unter die oberen Normgrenzen hin. Nachdem durch Verminderung der Kalorienzufuhr ideales Körpergewicht erreicht worden ist, sollen die Patienten auf isokalorischer Diät, bestehend zu je 40% aus Kohlenhydraten und vorwiegend ungesättigten Fettsäuren und zu 20% aus Protein, gehalten werden. Die Cholesterinaufnahme soll 300 mg/Tag nicht übersteigen. Diät allein führt in bis zu 65% der Fälle zur Normalisierung der Plasmalipidspiegel (12,31,40). Falls diätetische Maßnahmen aber nicht ausreichen, werden zusätzlich täglich 2,0 g Clofibrat verab-

reicht, welches sich bei der Hyperlipoproteinämie Typ III als am wirksamsten bewährt hat. Unter dieser kombinierten Therapie normalisieren sich bei etwa 95% der Patienten die Plasmalipide (40). Eine erfolgreiche Behandlung zeigt sich außerdem im prompten Verschwinden der Xanthome (4,14,17,38).

II Fragestellung

Basierend auf dem Nachweis des Apo E-III-Defektes soll zur Diagnosestellung der Hyperlipoproteinämie Typ III eine neue Methode entwickelt werden, bei der zur Isolierung der VLDL die bisher erforderliche Ultrazentrifugation durch ein einfaches und schnelles Verfahren ersetzt wird. Mit Hilfe dieser Methode soll über die Erfassung der für die HLP Typ III heterozygoten Individuen die Genhäufigkeit dieser Fettstoffwechselstörung in der Normalbevölkerung bestimmt werden. In einer hyperlipämischen Population sollen ferner mit dieser als Suchtest (Screening) eingesetzten Methode selektiv Patienten mit HLP Typ III ermittelt werden. Zusätzlich werden durch dieses Screening Aufschlüsse über die Häufigkeit einer bisweilen beobachteten zusätzlichen Apo E-IV-Bande in den VLDL erwartet. Weiterhin soll der Einfluß unterschiedlicher metabolischer Bedingungen auf den Apo E-Phänotyp untersucht werden. Anhand einer Familienuntersuchung soll die Annahme eines autosomal rezessiven Erbganges für die Typ III-HLP überprüft werden.

III Material und Methoden

1. Probanden

a) 15 Patienten, 7 Männer und 8 Frauen im Alter von 24 bis 71 Jahren, bei denen die Diagnose der Hyperlipoproteinämie Typ III schon gesichert war, wurden mit der neu entwickelten Methode nachuntersucht. Außerdem wurde die neue Methode an 15 heterozygoten Probanden, die nach Isolierung der VLDL durch Ultrazentrifugation ein intermediäres Apo E-Muster in der isoelektrischen Fokussierung zeigten, und an weiteren 15 Probanden mit normalen Apo E-Muster auf ihre Zuverlässigkeit hin erprobt.

b) Unter 490 zufällig ausgewählten Blutspendern der Marburger Blutbank wurde die neue Untersuchungsmethode zur Ermittlung der für die HLP Typ III homo- und heterozygoten Individuen eingesetzt, um die Genhäufigkeit dieser Fettstoffwechselstörung berechnen zu können. Die Blutspendergruppe bestand aus 346 Männern und 144 Frauen im Alter von 19 bis 66 Jahren.

c) Die Medizinische Poliklinik in Marburg stellte die Seren von insgesamt 227 ihrer hyperlipämischen Patienten zum Screening nach der Hyperlipoproteinämie Typ III zur Verfügung. Alle Seren erfüllten die Bedingung, daß ihre Cholesterinwerte über 300 mg/100 ml und/oder ihre Triglyceridwerte über 200 mg/100 ml lagen. Die Patienten setzten sich aus 128 Männern und 99 Frauen im Alter von 16 bis 79 Jahren zusammen, deren Krankengeschichten erst nach erfolgter Diagnosestellung eingesehen werden konnten.

d) Anhand der Familie der 65-jährigen Frau A.W., einer der unter Marburger Blutspendern entdeckten Probandin mit dem Phänotyp Apo E-D wurde der Erbgang dieses Merkmals untersucht. Die Familie umfaßt 4 Generationen mit 39 Mitgliedern im Alter von 7 bis 80 Jahren.

e) Am Beispiel der 4-köpfigen Familie des 16-jährigen Patienten V.B. mit Hyperlipoproteinämie Typ III sollte die Stabilität der 3 Apo E-Phänotypen unter unterschiedlichen

metabolischen Bedingungen überprüft werden.

2. Blutproben

Die Blutproben wurden durch Punktion der vorderen Cubitalvene gewonnen. Das Blut konnte für etwa 1 bis 2 Stunden bei Raumtemperatur gerinnen und wurde dann in einer Laborzentrifuge bei niedriger Geschwindigkeit zentrifugiert. Die erhaltenen Seren wurden bei $+4^{\circ}\text{C}$ gelagert und innerhalb der ersten 2 Tage zur Präparation der Lipoproteinfraktionen verwendet.

3. Methoden

a) Isolierung der VLDL mittels Ultrazentrifugation und Präparation der Apolipoproteine

Die VLDL wurden aus den Seren durch stufenweise Ultrazentrifugation bei $+4^{\circ}\text{C}$ in einer Beckmann Spinco L2 - 65B Ultrazentrifuge gemäß einer Standardmethode isoliert (22). Zunächst wurden die Seren bei ihrer Eigendichte von $d = 1,006\text{ g/ml}$ in einem 40.3 Rotor bei 40000 Umdrehungen pro Minute für 22 Stunden zentrifugiert. Das die VLDL enthaltende Flotat wurde mit einer Spritze gesammelt. Aus diesem ersten Flotat wurden die quantitativen Bestimmungen von Cholesterin und Triglyceriden und die Agarosegel-Elektrophorese der VLDL angefertigt. Zur Präparation der Apoproteine wurden die VLDL noch einmal unter identischen Bedingungen refluotiert. Anschließend wurden die gereinigten VLDL durch 5 aufeinanderfolgende Extraktionen mit je 50 Volumen eines Aceton-Äthanol-Gemisches 1:1 (V/V) bei -15°C delipifiziert. Die so erhaltene Apo-VLDL wurde in einem 0,02 M Äthylmorpholin-HCl-Puffer pH:8,5, der 8 M Harnstoff enthält, gelöst und dann isoelektrisch fokussiert.

b) Analytische isoelektrische Fokussierung

Die isoelektrische Fokussierung wurde in Polyacrylamid-Gelelektrophoren in $7,5 \times 0,5\text{ cm}$ großen Glasröhrchen ausgeführt. Die Proben wurden mit der aus 7,5% rekristallisiertem monomerem Acrylamid (Firma Serva, Heidelberg, BRD) und aus 0,2% N,N'-Methylenbisacrylamid (Firma Serva, Heidelberg, BRD) bestehen-

den Gellösung vermischt. Zusätzlich enthielten die Gele 6 M Harnstoff (Firma Serva, Heidelberg, BRD) und 2% Ampholine pH 3.5-10 (LKB Produkter, Bromma, Schweden). Die Polymerisation wurde durch die Zugabe von 10 μ l 5% Tetramethyläthylendamin (Firma Serva, Heidelberg, BRD) und 100 μ l Ammoniumpersulfat (70 mg/ml) (Firma Merck, Darmstadt, BRD) zu 10 ml der Gelmischung eingeleitet. Die Fokussierung erfolgte bei +4° C für 16 Stunden bei einer konstanten Spannung von 150 V. Als Elektrolytlösungen dienten eine 1,5% ortho-Phosphorsäure-Lösung an der Kathode und eine 2,5% Äthylendiamin-Lösung an der Anode. Nach der Fokussierung wurden durch eine 2-stündige Waschung der Gele mit einer 5% Trichloressigsäure -5% Sulfosalicylsäure-Lösung die Proteine fixiert und das Ampholine entfernt. Anschließend wurden die Gele für 2 Stunden in einer 0,1% Coomassie Brilliantblau R 250-Lösung (Eisessig-Äthanol-H₂O/10:45:45) gefärbt und letztlich in einem Eisessig-Äthanol-H₂O-Gemisch (10:25:65) solange entfärbt, bis die Apoproteinbanden deutlich sichtbar waren.

c) Agarosegel-Elektrophorese

Die Agarosegel-Elektrophorese wurde in Anlehnung an das von VAN MELSEN und Mitarb. beschriebene Verfahren ausgeführt (37). Die Herstellung des Agarosegels erfolgte durch Auflösen von 0,83 g OREO Agarose (Firma Behringwerke, Marburg, BRD) in einem Gemisch von 50 ml 0,05 μ Veronal-Barbital-Puffer pH:8,6 und 50 ml Aqua bidest.. Nach 20-minütigem Kochen und anschließender Abkühlung der Lösung auf 55° C wurden 0,3 g ORHD Serum-Albumin vom Rind (Firma Behringwerke, Marburg, BRD) zugegeben. Dann wurden 15,6 ml des Agarose-Puffers auf eine 9 x 12 cm große Glasplatte verteilt und durch weitere Abkühlung zum Erstarren gebracht. Nachdem die Serumproben durch die Zugabe eines gleichgroßen Anteils an Agarose-Puffer bei 55° C auf 1:2 verdünnt worden waren, wurden je 100 μ l dieser Proben in vorgestanzte Löcher des Agarosegels eingefüllt. Als Elektrophoresepuffer dienten 2 Liter des verdünnten 0,025 μ Veronal-Barbital-Puffers pH:8,6. Bei einer konstanten Spannung von 220 Volt betrug die Lauf-

zeit der Elektrophorese etwa 4 Stunden, bis nämlich das zusätzlich aufgetragene Bromphenolblau in Albuminbindung eine Trennstrecke von 5 cm zurückgelegt hatte. Die Glasplatten wurden während der Elektrophorese durch einen ständigen Wasserfluß gekühlt. Anschließend wurde die Gelschicht für 2 Stunden in einem Methanol-Äthanol-Essigsäure-H₂O-Gemisch (47,5:3:5:47,5) fixiert. Nach dem Trocknen wurden die Agarosegele für weitere 2 Stunden mit Sudanschwarz (1 g/1000 ml Sudanschwarz und 10g/1000 ml Zinkacetat in 60% Äthanol) gefärbt und letztlich in 60% Äthanol entfärbt.

d) Cholesterin- und Triglyceridbestimmung

Cholesterin und Triglyceride wurden mit Hilfe der Test-Combination Cholesterin Enzymatischer Farbtest bzw. der Test-Combination Triglyceride vollenzymatisch (Firma Boehringer, Mannheim, BRD) gemäß den beiliegenden Anleitungen bestimmt. Diese Tests wurden nach den von RÜSCHLAU und Mitarb. bzw. den von WAHLEFELD beschriebenen Methoden zur Cholesterin- bzw. Triglycerid-Bestimmung entwickelt (45,58).

e) Densitometrie

Die densitometrischen Messungen der durch isoelektrische Fokussierung erhaltenen Apolipoproteinbanden wurden mit dem Vitatron TLD-100, dem Moltronic Scanning Densitometer (Firma Molter, Heidelberg, BRD) und dem Elektrophorese Scanner CAMAG durchgeführt.

IV ERGEBNISSE

IV 1. Eine einfache Methode zur Diagnose der Hyperlipoproteinämie Typ III: Nachweis der Apo E-Phänotypen ohne Ultrazentrifugation

Da bisher zur Darstellung des Apo E-Musters mittels isoelektrischer Fokussierung die vorherige Isolierung der VLDL, durch die aufwendige Ultrazentrifugation erforderlich war, wurde nun zur Isolierung der VLDL aus Humanserum ohne Ultrazentrifugation ein von BURSTEIN und Mitarb. beschriebenes Verfahren (5) so abgewandelt, daß es sich einfach mit der anschließenden isoelektrischen Fokussierung kombinieren ließ. Dieser Test verbindet die Präzipitation der VLDL aus Humanserum, die Lipidextraktion und die isoelektrische Fokussierung der Apo-VLDL in einem einfachen und schnellen Verfahren, wie in Abbildung 1 schematisch dargestellt wird.

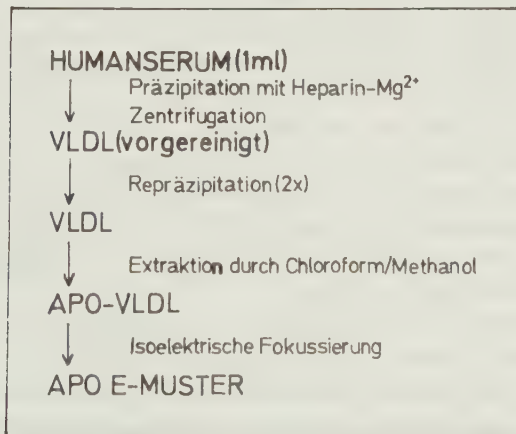


Abb. 1: Schema der Methode zur Darstellung der verschiedenen Apo E-Muster ohne Ultrazentrifugation.

Der Test wird im einzelnen wie folgt durchgeführt:

Zu 1 ml Humanserum in einem kleinen konischen, mit einem Stöpsel versehenen Plastikröhrchen (Firma Eppendorf, Hamburg, BRD) werden 50 μ l einer 5% Heparin-Lösung (Firma Hoffmann-La Roche, Grenzach, Schweiz) und 50 μ l einer 2 M $MgCl_2$ -Lösung gegeben, so daß Endkonzentrationen von 0,23% Heparin und 0,09 M Mg^{2+} erreicht werden. Die Mischung wird 2 min lang geschüttelt und darf weitere 30 min bei Zimmertemperatur reagieren. Dann werden die Proben für 6 min in einer Tischzentrifuge (Firma Eppendorf, Hamburg, BRD) zentrifugiert. Die Lipoprotein- Mg^{2+} -Heparin-Komplexe flotieren und bilden an der Oberfläche eine sahnige Schicht. Der klare Unterstand wird vorsichtig mit Nadel und Spritze abgesaugt und verworfen. Der sahnige Überstand wird in 0,5 ml einer 0,02 M Tris-HCl-Lösung pH:7,7, die zusätzlich 0,1 M NaCl und 0,017 M Na-Citrat enthält, resuspendiert und durch Zugabe von 25 μ l 2 M $MgCl_2$ erneut gefällt. Nach 2-minütigem Schütteln und einer 30-minütigen Reaktionszeit wird wiederum für 6 min zentrifugiert und der Unterstand entfernt. Diese Waschprozedur wird nochmals wiederholt.

Zur Extraktion der Lipide werden der Lipoprotein-Präparation 0,75 ml eines Chloroform-Methanol-Gemisches 2:1 (V/V) hinzugefügt und die Röhrchen für 10 min geschüttelt. Dann werden weitere 0,25 ml Methanol zugegeben und die Suspension 4 min lang zentrifugiert. Der die Lipide enthaltende Chloroform-Methanol-Überstand wird durch Abgießen verworfen; die im Reaktionsgefäß zurückgebliebenen Apolipoproteine dürfen an der Luft trocknen.

Anschließend wird die Apo-VLDL in einem 8 M Harnstoff enthaltenden 0,02 M Äthylmorpholin-HCl-Puffer pH:8,5 gelöst, und die unlöslichen Substanzen (Apo B) werden durch Zentrifugation pelletiert. Der klare Überstand, der hauptsächlich Apo C- und Apo E-Polypeptide enthält, wird nun in Polyacrylamidgelen mit einem pH-Gradienten von 3,5-10 isoelektrisch fokussiert, wie im Kapitel "Material und Methoden" ausführlich beschrieben wurde.

Für alle Seren mit Triglyceridwerten von etwa 40-400 mg/100

ml konnte die oben angegebene Fällungsmethode unmodifiziert angewendet werden. Seren mit höheren Triglyceridkonzentrationen hingegen, besonders wenn sie Chylomikronen enthielten, mußten zunächst durch Zugabe von 0,9% NaCl auf einen Triglyceridwert von 400 mg/100 ml verdünnt werden. Andernfalls konnten die Apo E-II- und Apo E-III-Banden nach isoelektrischer Fokussierung häufig nicht nachgewiesen werden, wohingegen die Apo C- und Apo E-I-Polypeptide gut dargestellt werden konnten. Da das so entstandene Apo E-Muster mit dem für die HLP Typ III charakteristischen Apo E-III-Defekt verwechselt werden könnte, müssen Seren mit Triglyceridwerten über 400 mg/100 ml vor der Fällung unbedingt im richtigen Verhältnis verdünnt werden.

Gelegentlich reichten bei sehr niedrigen Serumtriglyceridwerten die aus 1 ml Serum gefällten VLDL nicht aus, um nach isoelektrischer Fokussierung deutlich sichtbare Apoproteinbanden zu ergeben. Aber auch in solchen Fällen konnte eine klare Diagnose erzielt werden, indem bei der Wiederholung eine größere Menge Serum zur Fällung bereitgestellt wurde. Diese Situation kam bei Typ III-Patienten jedoch nicht vor.

Die Seren von insgesamt 45 Probanden, deren Apo E-Muster nach Isolierung der VLDL durch Ultrazentrifugation und anschließender isoelektrischer Fokussierung der harnstofflöslichen Apo-VLDL schon bekannt waren, wurden mit der neuen Methode nachuntersucht. Die Probandengruppe setzte sich aus 15 Individuen mit dem Apo E-III-Defekt (55), 15 Individuen mit dem "intermediären" Apo E-Muster und 15 Individuen mit dem normalen Apo E-Muster zusammen.

Die Apo E-Fokussierungsmuster, die nach Isolierung der VLDL mittels Heparin-Mg²⁺-Fällung erhalten wurden, waren identisch mit denjenigen, bei denen die VLDL durch Ultrazentrifugation isoliert worden waren (Abb. 2). In allen Fällen wurden die schon früher gestellten Diagnosen bestätigt. Die Darstellung der Apo E-Phänotypen ist folglich unabhängig von der Methode, die zur Isolierung der VLDL verwendet wird.

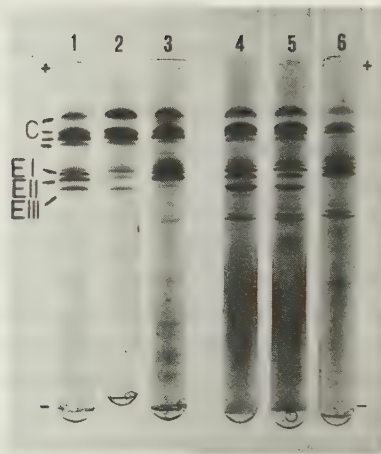


Abb. 2: Analytische isoelektrische Fokussierung harnstofflöslicher Apo-VLDL in Poyacrylamid-Gelen mit einem pH-Gradienten von 3,5 (oben) bis 10 (unten). Die VLDL wurden durch Ultrazentrifugation (1-3) oder durch Heparin-Mg²⁺-Fällung (4-6) von einem Individuum mit normalem Apo E-Phänotyp (2,5), einem Individuum mit "intermediärem" Apo E-Phänotyp (1,4) und einem Individuum mit Apo E-III-Defizienz (3,6) isoliert.

Die hier beschriebene, auf dem Nachweis eines spezifischen genetischen Merkmals beruhende, einfache, schnelle, billige und zuverlässige Methode zur Diagnostik der Hyperlipoproteinämie Typ III sollte es gestatten, nicht entdeckte Genträger durch Screening zu erfassen, die formale Genetik der Erkrankung abzuklären und ihre Häufigkeit in populationsgenetischen Untersuchungen zu bestimmen.

IV 2. Konstanz der Apo E-Phänotypen unter unterschiedlichen metabolischen Bedingungen

Um zu klären, ob die verschiedenen Apo E-Phänotypen unabhängig von unterschiedlichen metabolischen Bedingungen nachweisbar sind und folglich die Apo E-III-Defizienz als ein stabiles qualitatives Merkmal zur Diagnose der HLP Typ III verwendet werden kann, wurde die Zusammensetzung der VLDL von Individuen mit verschiedenen Apo E-Phänotypen durch diätetische Maßnahmen gezielt geändert.

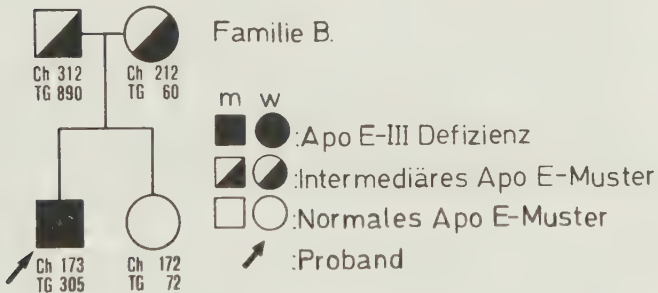


Abb. 3: Stammbaum der Familie V.B.

Als Probanden dienten die Mitglieder einer 4-köpfigen Familie (Abb. 3): der 38-jährige Vater H.B. und die 36-jährige Mutter D.B. wiesen das intermediäre Apo E-Muster auf; der 16-jährige Sohn V.B., der durch Screening mit Hilfe der neuen Methode unter hyperlipämischen Patienten entdeckt worden war, zeigte die Apo E-III-Defizienz; die 12-jährige Tochter R.B. besaß das normale Apo E-Muster. Die diätetischen Maßnahmen umfaßten 1. eine Vorperiode mit ad libitum Ernährung, 2. eine einwöchige isokalorische fettreiche Ernährung (65% Fett, 20% Kohlenhydrate, 15% Eiweiß), 3. eine einwöchige isokalorische kohlenhydratreiche Ernährung (20% Fett, 65% Kohlenhydrate, 15% Eiweiß) und 4. ein ad li-

Tabelle 1: Einfluß unterschiedlicher metabolischer Bedingungen auf die Lipidwerte und

Apo E-Muster der Mitglieder der Familie V.B.

Metabolische Bedingungen: 1. ad libitum Ernährung, 2. isokalorische fettreiche Ernährung, 3. isokalorische kohlenhydratreiche Ernährung, 4. postprandial.

Individuum Alter Geschlecht	metabol. Beding.	Serumlipide Ch TG	VLDL Ch TG	VLDLCh/TG	ChVLDL/ TG Serum	β -VLDL	Apo E-Muster		
H.B. 28 J. männl.	1.	318	864	180,2	356,7	0,50	0,21	-	intermediär
	2.	230	255	76,5	170,0	0,45	0,30	-	intermediär
	3.	252	938	130,5	428,0	0,30	0,14	-	intermediär
	4.	315	835	229,6	332,0	0,69	0,27	-	intermediär
H.B. 35 J. weibl.	1.	214	60	6,8	9,7	0,70	0,11	-	intermediär
	2.	142	46	4,5	9,0	0,50	0,10	-	intermediär
	3.	176	50	5,6	13,2	0,42	0,11	-	intermediär
	4.	208	71	7,7	18,4	0,42	0,11	-	intermediär
V.B. 16 J. männl.	1.	184	109	35,0	67,0	0,52	0,32	+	E-III-Defekt
	2.	137	75	15,0	32,0	0,47	0,20	+	E-III-Defekt
	3.	144	126	19,3	43,1	0,45	0,15	+	E-III-Defekt
	4.	165	206	30,7	93,0	0,33	0,15	+	E-III-Defekt
R.B. 12 J. weibl.	1.	173	84	14,2	34,4	0,41	0,17	-	normal
	2.	136	62	3,0	17,0	0,18	0,05	-	normal
	3.	119	80	10,2	16,7	0,61	0,13	-	normal
	4.	143	100	8,4	26,7	0,31	0,08	-	normal

bitum Mahl mit postprandialer Blutentnahme (4 Std. nach der Nahrungsaufnahme). Zur Untersuchung des Einflusses der 3 erstgenannten metabolischen Bedingungen auf den Apo E-Phänotyp wurde den Probanden nach Ablauf der Diätperiode Nüchternblut entnommen. Von allen Blutproben wurden 1. die Cholesterin- und Triglyceridwerte im Serum und in den VLDL bestimmt, 2. die durch Ultrazentrifugation und Heparin-Mg²⁺-Fällung isolierte Apo-VLDL isoelektrisch fokussiert und 3. eine Lipidelektrophorese angefertigt (Tabelle 1).

Die unterschiedlichen metabolischen Bedingungen bewirkten deutliche Schwankungen der Cholesterin- und Triglyceridkonzentrationen im Serum und in den VLDL, woraus wiederum inkonstante Werte für das Verhältnis von Cholesterin zu Triglyceriden in den VLDL und für den Quotienten aus VLDL-Cholesterin und Serum-Triglyceriden resultierten. So erfüllte der 16-jährige Proband V.B., der die Apo E-III-Defizienz aufweist, nur nach der ad libitum Ernährung der Vorperiode das von FREDRICKSON und Mitarb. (15) vorgeschlagene lipidchemische Kriterium der HLP Typ III mit einem Wert von mehr als 0,30 für den Quotienten aus VLDL-Cholesterin und Serum-Triglyceriden. Unter den 3 übrigen metabolischen Bedingungen aber wurde der geforderte Wert von 0,30 bei weitem nicht erreicht (Tabelle 1). Die Fokussierungsmuster der 3 Apo E-Phänotypen hingegen blieben unter den unterschiedlichen experimentellen Bedingungen stabil. Von großer praktischer Bedeutung ist außerdem, daß auch in den postprandialen VLDL die Apo E-Phänotypen einschließlich der Apo E-III-Defizienz zuverlässig nachgewiesen werden können. Zukünftig kann also zur Darstellung der Apo E-Phänotypen auf eine Nüchternblutentnahme verzichtet werden.

IV 3. Häufigkeit der Apo E-Phänotypen in einer deutschen Bevölkerungsprobe

Um zuverlässige Angaben über die Häufigkeit der verschiedenen Apo E-Phänotypen (1. normales Muster, 2. "intermediäres" Muster, 3. Muster der Apo E-III-Defizienz) in der Normalbevölkerung zu erhalten, wurden mit Hilfe der neuen Methode bei 490 Marburger Blutspendern die Apo E-Muster bestimmt.

Die Apo E-Muster wurden durch densitometrische Messung der gefärbten Gele ausgewertet (Abb. 4). Entscheidend für die Typisierung war das Verhältnis von Apo E-II zu Apo E-III. Die Apo E-II/E-III-Quotienten von 180 Blutspendern sind in Abb. 5 aufgetragen. Auffallend ist eine deutliche dreigipflige Verteilung der Apo E-Muster, die 3 verschiedenen Phänotypen entspricht. Diese Phänotypen werden als Apo E-N (normales Apo E-Muster), Apo E-ND ("intermediäres" Apo E-Muster) und Apo E-D (Muster der Apo E-III-Defizienz) bezeichnet. Für den Phänotyp Apo E-N ergibt sich ein mittleres Apo E-II/E-III-Verhältnis von $0,40 \pm 0,07$, für den Phänotyp Apo E-ND ein Verhältnis von $1,02 \pm 0,25$ und für den Phänotyp Apo E-D ein Verhältnis von $9,07 \pm 4,48$. Zwischen den verschiedenen Phänotyp-Gruppen wurde keine Überlappung beobachtet.

Bei der Auswertung der Apo E-Muster der 490 Blutspender wurde in 83,3% der Phänotyp Apo E-N, in 15,7% der Phänotyp Apo E-ND und in 1,0% der Phänotyp Apo E-D gefunden (Tabelle 2). Bei der Häufigkeitsverteilung der Apo E-Phänotypen bei beiden Geschlechtern (Tabelle 2) oder in verschiedenen Altersklassen (Tabelle 3) wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede festgestellt. Familienuntersuchungen, die von UTERMANN und Mitarb. (53,56) sowie für die Familie A.W. (siehe Kap. IV 7) von mir durchgeführt wurden, und die Häufigkeitsverteilung der Apo E-Phänotypen in der Bevölkerung zeigen, daß das Apoprotein E einen genetischen Polymorphismus aufweist: die 3 Phänotypen Apo E-N, Apo E-ND und Apo E-D werden durch die 2 Allele Apo Eⁿ und Apo E^d bestimmt. Die in dieser Untersuchung beobachteten



Abb. 4: Densitometrische Messung von mit Coomassie Brilliantblau gefärbten Fokussierungsgelen: Individuelle Apo-VLDL-Aufarbeitungen, die (A) das normale Apo E-Muster, (B) das Muster der Apo E-III-Defizienz und (C) das "intermediäre" Apo E-Muster zeigen, wurden in 7,5% Polyacrylamidgelen mit einem pH-Gradienten von 3.5-10 isoelektrisch fokussiert.

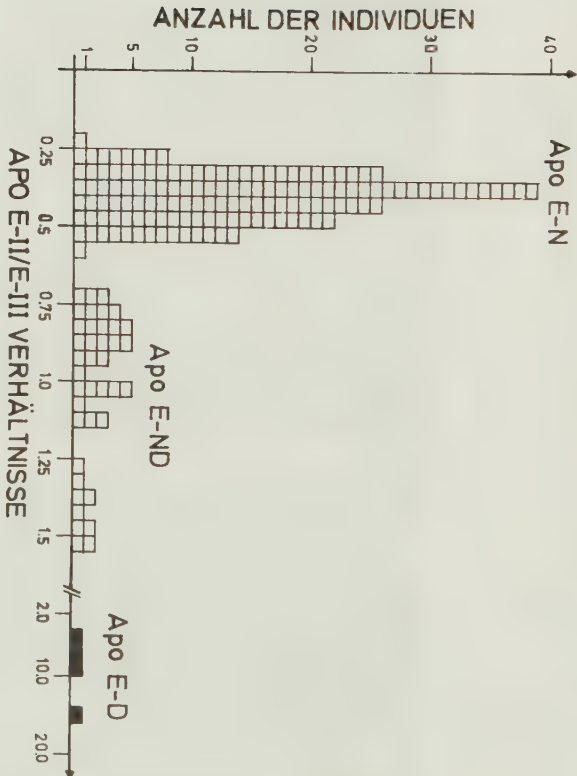


Abb. 5: Verteilung der Apo E-Muster bei Blutspendern entsprechend den Apo E-II/E-III-Verhältnissen der individuellen Apo-VLDL-Proben (N=180), die durch Densitometrie bestimmt wurden. (Jedes Kästchen stellt ein Individuum dar. Probanden mit Primärer Dysbetaloproteinämie sind schwarz gekennzeichnet.)

Tabelle 2: Apo E-Phänotypen und Genhäufigkeiten bei 490 Blutspendern

	beobachtet	erwartet ⁺)	
Alle Individuen			
Apo E-N	408 (83,3%)	407	
Apo E-ND	77 (15,7%)	79	Apo E ⁿ = 0,9112
Apo E-D	5 (1,0%)	4	Apo E ^d = 0,0888
Total	490 (100 %)	490	
Männer			
Apo E-N	285 (82,4%)	285	
Apo E-ND	58 (16,8%)	58	Apo E ⁿ = 0,9075
Apo E-D	3 (0,9%)	3	Apo E ^d = 0,0925
Total	346 (100 %)	346	
Frauen			
Apo E-N	123 (85,4%)	122	
Apo E-ND	19 (13,2%)	21	Apo E ⁿ = 0,9201
Apo E-D	2 (1,4%)	1	Apo E ^d = 0,0799
Total	144 (100 %)	144	

⁺) erwartete Werte gemäß dem Hardy-Weinberg-Gesetz

Tabelle 3: Häufigkeit der Apo E-Phänotypen bei Blutspendern verschiedener Altersklassen

Alter	Total	Apo E-N	Apo E-ND	Apo E-D
< 30 J.	284 (100%)	246 (86,6%)	35 (12,3%)	3 (1,1%)
30-44 J.	144 (100%)	113 (78,5%)	31 (21,5%)	0 (0 %)
> 44 J.	62 (100%)	49 (79,0%)	11 (17,8%)	2 (3,2%)

Phänotyphäufigkeiten entsprechen der theoretischen Erwartung aufgrund des Hardy-Weinberg-Gesetzes (Tabelle 2). Aus den in diesem Kapitel angeführten Daten läßt sich für das Allel Apo E^d eine Genhäufigkeit von 0,0888 in der deutschen Bevölkerungsprobe errechnen.

IV 4. Phänotyp Apo E-D und das Auftreten von Dysbetalipoproteinämie

In Anbetracht der Tatsache, daß in früheren Studien (55) alle für das Allel Apo E^d homozygoten Individuen an Hyperlipoproteinämie Typ III erkrankt waren und daß diese Fettstoffwechselstörung als eine sehr seltene Erkrankung angesehen wurde (29,39), war die Häufigkeit des Allels Apo E^d mit 0,0888 unerwartet hoch. Deshalb sollte geklärt werden, ob auch bei den unter den Blutspendern entdeckten 5 Probanden mit dem Phänotyp Apo E-D eine typische HLP Typ III vorlag.

Die biochemischen Untersuchungen ergaben, daß die 5 Blutspender mit Apo E-III-Defizienz eine gesonderte Gruppe mit Abnormalitäten in ihrem Lipoproteinspektrum darstellten, wie sie für die HLP Typ III charakteristisch sind: 1. eine abnorme quantitative Verteilung der Lipoproteine mit verminderten Mengen an LDL-2 und vermehrten Mengen an VLDL und LDL-1 nach Dichtegradient-Ultrazentrifugation, 2. eine deutlich abgeschwächte oder fehlende LDL-Bande in der Polyacrylamid-Elektrophorese, 3. VLDL mit elektrophoretischer β -Mobilität (Abb. 6) und 4. eine Zunahme der relativen und absoluten Cholesterinkonzentrationen in den VLDL. (Diese Untersuchungsergebnisse wurden durch das Labor von Dr. UTERMANN erhoben.)

In Tabelle 4 sind die wichtigsten Laborbefunde, die für die Blutspender mit dem Phänotyp Apo E-D ermittelt wurden, zusammengestellt: Zusätzlich zum Nachweis der " β -VLDL" erfüllten alle 5 Probanden zumindest eines der für die Typ III-HLP vorgeschlagenen lipidchemischen Kriterien. Aber keiner der Probanden wies eine Hypercholesterinämie auf; das Serumcholesterin der 3 noch nicht 30 Jahre alten Probanden war mit Werten von < 130 mg/100 ml vielmehr sogar abnorm niedrig. Nur bei 3 Probanden wurde eine leichte Hypertriglyceridämie beobachtet. Nach den vorliegenden Befunden scheint demnach der von HAVEL (23) vorgeschlagene Ausdruck "Primäre Dysbetalipoproteinämie" diese Fettstoffwechselstörung am besten zu charakterisieren.

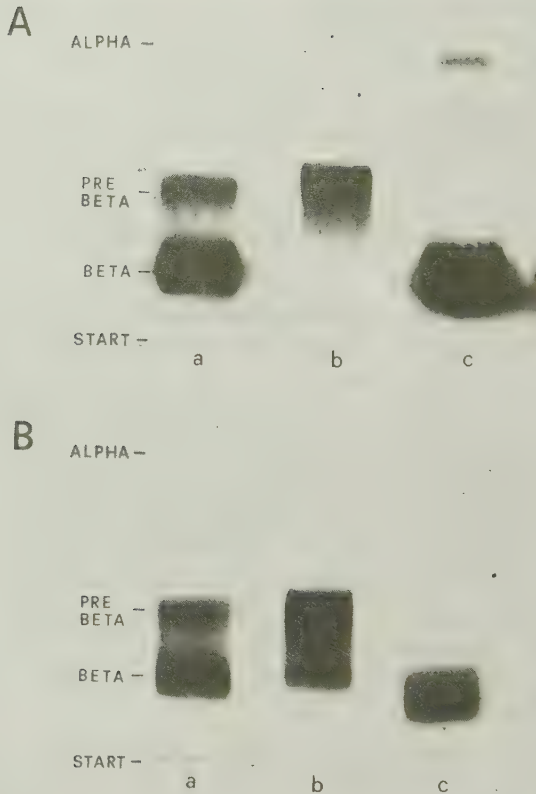


Abb. 6: Agarosegel-Elektrophorese des Serums (a), der VLDL (b) und der Fraktion $d > 1.006$ g/ml (c) einer Kontrollperson (A) und eines Probanden mit dem Phänotyp Apo E-D (B). Färbung mit Sudanschwarz B.

Tabelle 4: Laborbefunde der 5 Probanden mit dem Phänotyp Apo E-D

Individuum	Alter Geschlecht	Ch	Serum TG	Ch	VLDL ¹⁾ TG	VLDL Ch/TG	Ch _{VLDL} / TG _{Serum}	B-VLDL
B.Z.	24/m	89	77	23	61	0.38	0.30	+
B.Th.	26/m	128	157	64	83	0.77	0.41	+
M.B.	28/w	113	78	42	45	0.94	0.54	+
G.W.	60/m	196	151	41	66	0.61	0.27	+
A.W.	65/w	190	118	34	60	0.57	0.29	+
Mittelwert	$\pm$ SA	141 $\pm$ 45	128 $\pm$ 47	42 $\pm$ 15	66 $\pm$ 14	0.65 $\pm$ 0.22	0.35 $\pm$ 0.12	
Kontrollen ²⁾	$\pm$ SA	191 $\pm$ 31	102 $\pm$ 34	17 $\pm$ 6	59 $\pm$ 39	0.32 $\pm$ 0.15	0.17 $\pm$ 0.07	

1) Um zuverlässige Daten zu erhalten, wurden die VLDL aus 200-250 ml Serum isoliert. Die Lipidwerte sind als Mittelwert der direkten und indirekten Bestimmung angegeben.

2) Eine Gruppe von 5 in Alter und Geschlecht angepassten Blutspendern mit dem Phänotyp Apo E-N dienten als Kontrollen. (Ergebnis von A. STEINMETZ)

IV 5. Häufigkeit der Apo E-Phänotypen und der Hyperlipoproteinämie Typ III in einer hyperlipämischen Population.

Durch Screening unter 227 hyperlipämischen Patienten sollte geklärt werden, ob mit Hilfe der kombinierten Fällungs- und Fokussierungsmethode (Kapitel IV 1) Patienten mit Hyperlipoproteinämie Typ III selektiv erkannt werden können und wie häufig diese Fettstoffwechselstörung in einer hyperlipämischen Population vorkommt.

Die Apo E-Fokussierungsmuster der durch Heparin-Mg²⁺-Fällung isolierten Apo-VLDL konnten entsprechend ihren Apo E-II/E-III-Verhältnissen den 3 Phänotypen Apo E-N, Apo E-ND und Apo E-D zugeordnet werden. In Abb. 7 sind die densitometrisch bestimmten Apo E-II/E-III-Quotienten von 139 hyperlipämischen Patienten eingetragen. Wie schon bei den Blutspendern wird auch in dieser Abbildung eine den 3 verschiedenen Phänotypen entsprechende dreigipflige Häufigkeitsverteilung deutlich, mit mittleren Quotienten für den Phänotyp Apo E-N von $0,41 \pm 0,09$, für Apo E-ND von $1,09 \pm 0,46$ und für Apo E-D von $11,93 \pm 2,11$.

Schwierigkeiten bei der Klassifizierung bereitete anfangs das Fokussierungsmuster des Patienten V.Sch. mit einem Apo E-II/E-III-Verhältnis von 3,19. Da aber die VLDL des V.Sch. keines der lipidchemischen Kriterien der HLP Typ III erfüllten (15,26,39) und außerdem nicht die für die HLP Typ III charakteristische elektrophoretische β -Mobilität zeigten (12), wurde das Fokussierungsmuster des V.Sch. dem heterozygoten Phänotyp Apo E-ND zugerechnet. Als Schnittpunkt zwischen den Phänotypen Apo E-ND und Apo E-D muß demnach ein Apo E-II/E-III-Quotient in Höhe von etwa 3,50 angesetzt werden.

In dem hyperlipämischen Patientenkollektiv wurden 166 Probanden (73,1%) mit dem Phänotyp Apo E-N, 57 Probanden (25,1%) mit dem Phänotyp Apo E-ND und 4 Probanden (1,8%) mit dem Phänotyp Apo E-D gefunden (Tabelle 5). Weder zwischen Männern und Frauen (Tabelle 5) noch zwischen verschiedenen Al-

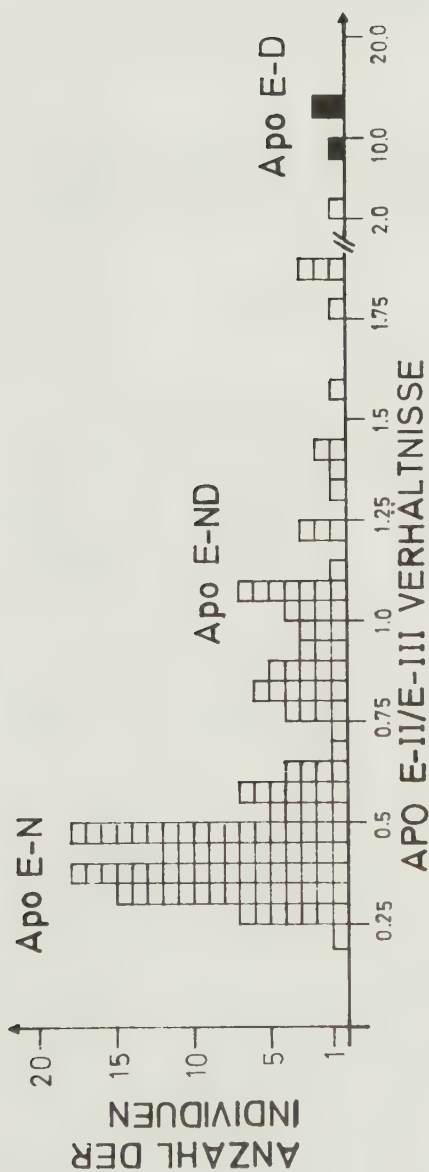


Abb. 7: Verteilung der Apo E-Muster bei hyperlipämischen Patienten entsprechend den Apo E-II/E-III-Verhältnissen der individuellen Apo-VLDL-Proben (N=139), die durch Densitometrie bestimmt wurden. (Jedes Kästchen stellt ein Individuum dar. Probanden mit Hyperlipoproteinämie Typ III sind schwarz gekennzeichnet.)

Tabelle 5: Apo E-Phänotypen und Genhäufigkeiten bei hyperlipämischen Patienten

	beobachtet	erwartet ⁺	
Alle Individuen			
Apo E-N	166 (73,1%)	188,5	
Apo E-ND	57 (25,1%)	36,7	Apo E ^N = 0,8568
Apo E-D	4 (1,8%)	1,8	Apo E ^d = 0,1432
Total	227 (100 %)	227,0	
Männer			
Apo E-N	91 (71,1%)	106,3	
Apo E-ND	35 (27,3%)	20,7	Apo E ^N = 0,8477
Apo E-D	2 (1,6%)	1,0	Apo E ^d = 0,1523
Total	128 (100 %)	128,0	
Frauen			
Apo E-N	75 (75,8%)	82,2	
Apo E-ND	22 (22,2%)	16,0	Apo E ^N = 0,8687
Apo E-D	2 (2,0%)	0,8	Apo E ^d = 0,1313
Total	99 (100 %)	99,0	

⁺) erwartete Daten aufgrund der in der Normalbevölkerung ermittelten Genhäufigkeiten

Tabelle 6: Häufigkeit der Apo E-Phänotypen bei hyperlipämischen Patienten verschiedener Altersklassen

Alter	Total	Apo E-N	Apo E-ND	Ap E-D
< 40 J.	31 (100%)	20 (64,5%)	10 (32,3%)	1 (3,2%)
40-49 J	57 (100%)	38 (66,7%)	19 (33,3%)	0 (0 %)
50-59 J.	53 (100%)	45 (84,9%)	8 (15,1%)	0 (0 %)
60-79 J.	86 (100%)	63 (73,3%)	20 (23,3%)	3 (3,5%)

tersklassen (Tabelle 6) wurden signifikante Unterschiede in der Häufigkeitsverteilung der Phänotypen festgestellt. Aus den vorliegenden Daten läßt sich für die Gruppe hyperlipämischer Patienten eine Genhäufigkeit von 0,1432 für das Allel Apo E^d berechnen. Das Allel Apo E^d kommt damit in der hyperlipämischen Population signifikant häufiger ($p < 0,002$) vor als in der Normalbevölkerung. Aber nicht nur die Genhäufigkeit, die von der Anzahl der für das Allel Apo E^d homozygoten und heterozygoten Individuen abhängig ist, sondern auch die Häufigkeit der heterozygoten Individuen allein ist in der hyperlipämischen Population signifikant größer ($p < 0,003$) als in der Normalbevölkerung.

Bei einem der insgesamt 4 hyperlipämischen Patienten mit dem Phänotyp Apo E-D war die Hyperlipoproteinämie Typ III schon vorher bekannt gewesen; bei den übrigen 3 Patienten wurde erst bei dieser Untersuchung durch Screening mit Hilfe der neuen Methode die Typ III-HLP entdeckt und anschließend durch klassische Methoden bestätigt. Die 4 Patienten boten charakteristische Zeichen der HLP Typ III (Tabelle 7): Alle 4 Patienten wiesen eine deutliche β -VLDL-Unterfraktion auf und besaßen cholesterinreiche VLDL mit einem Verhältnis von Cholesterin zu Triglyceriden von mehr als 0,42. Sie erfüllten damit alle das von HAZZARD und Mitarb. (26) vorgeschlagene lipidchemische Kriterium der HLP Typ III. 2 Patienten

hatten ein Verhältnis von VLDL-Cholesterin zu Serum-Triglyceriden von $> 0,30$ und stellten damit gemäß der Definition von FREDRICKSON und Mitarb. (15) zweifellos Typ III-Patienten dar. Die anderen 2 Patienten zeigten für das gleiche Verhältnis Werte zwischen 0,25 und 0,30 und sind daher nach der gleichen Definition als "mögliche Typ III-Patienten" einzustufen. Die 3 älteren Patienten boten an charakteristischen klinischen Manifestationen Zeichen einer arteriosklerotischen Gefäßerkrankung, aber keine Xanthome. Der jüngste Patient, der keine klinischen Zeichen der Hyperlipoproteinämie Typ III besaß, aber eine β -VLDL und gelegentlich eine leichte Hypertriglyceridämie aufwies, war ein erst 16 Jahre alter Junge.

Die Ergebnisse dieses Screening-Programms verdeutlichen also, daß mit Hilfe der neuen Methode Patienten mit Typ III-HLP selektiv in einer hyperlipämischen Population erkannt werden können.

Tabelle 7: Wichtige Befunde der 4 hyperlipämischen Patienten mit dem Phänotyp Apo E-D

Individuum	Alter Geschlecht	Serum Ch	TG	VLDL _{Ch} /TG	Ch _{VLDL} /TG _{Serum}	β-VLDL	Klinische Befunde
H.Sch.	67/m	226	220	1,10	0,27	+	Herzinfarkt
C.B.	67/w	374	609	0,53	0,38	+	Herzinfarkt Diabetes mellitus
D.B.	64/w	451	942	0,76	0,28	+	General.Arteriosklerose Hypertonie Chron.Pyelonephritis Hyperurikämie lat.Diabetes mellitus
V.B.	16/m	173	305	0,45	0,32	+	Hypertonie

IV 6. Häufigkeit der Apo E-IV-Variante

Nach isoelektrischer Fokussierung der Apo-VLDL fiel bisweilen ein weiterer Apo E-Phänotyp auf, der durch die Gegenwart einer zusätzlichen kathodischen Apo E-Bande (+E-IV-Variante) gekennzeichnet war. Es war unwesentlich, ob zur Isolierung der VLDL die Ultrazentrifugation oder die Heparin-Mg²⁺-Fällung gewählt wurde, da beide Verfahren identische Apo E-Muster ergaben. Abbildung 8 zeigt Fokussierungsgele der Phänotypen Apo E-N und Apo E-ND, die zusätzlich noch die kathodische Apo E-IV-Bande aufweisen.

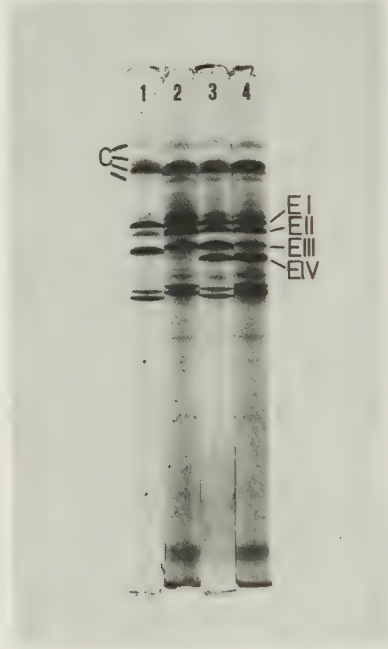


Abb. 8: Analytische isoelektrische Fokussierung harnstofflöslicher Apo-VLDL von 4 Individuen mit verschiedenen Apo E-Phänotypen in Polyacrylamid-Gelen mit einem pH-Gradienten von 3,5 (oben) bis 10 (unten):
1. Apo E-N/E-IV(-), 2. Apo E-ND/E-IV(-),
3. Apo E-N/E-IV(+), 4. Apo E-ND/E-IV(+).

Tabelle 8: Häufigkeit der Apo E-IV-Variante bei 490 Blutspendern

	Total	Apo E-IV
Alle Individuen	490 (100%)	132 (26,9%)
Männer	346 (100%)	94 (27,2%)
Frauen	144 (100%)	38 (26,4%)

Tabelle 9: Häufigkeit der Apo E-IV-Variante bei 227 hyperlipämischen Patienten

	Total	Apo E-IV
Alle Individuen	227 (100%)	64 (28,2%)
Männer	128 (100%)	39 (30,5%)
Frauen	99 (100%)	25 (25,3%)

Unter den 490 Marburger Blutspendern wurde bei 132 Probanden (26,9%) und unter den 227 hyperlipämischen Patienten der Medizinischen Poliklinik Marburg wurde bei 64 Patienten (28,2%) die Apo E-IV-Variante nachgewiesen. In beiden Gruppen kam die Apo E-IV-Variante also etwa gleich häufig vor (Tabellen 8 und 9). Es bestanden weder eine Geschlechts- (Tab. 8 u. 9) noch eine Altersabhängigkeit für das Auftreten der Apo E-IV-Variante. Familienuntersuchungen, die von UTERMANN und Mitarb. (54) durchgeführt wurden, ergaben, daß die Apo E-IV-Variante autosomal dominant übertragen wird, daß sie unabhängig von dem Apo E-II/E-III-Polymorphismus ist und daß keine genetische Kopplung zwischen beiden Systemen besteht. Die Familienuntersuchungen und die Häufigkeitsverteilung in der Bevölkerung zeigen also, daß die Apo E-IV-Variante einen genetischen Polymorphismus darstellt. Die 2 Phänotypen, die durch die Gegenwart oder das Fehlen des E-IV-Proteins gekennzeichnet sind, werden durch die 2 Allele Apo E-IV⁺ und Apo E-IV⁻ bestimmt. Unter dieser Annahme läßt sich aufgrund der vorliegenden Daten für das Allel Apo E-IV⁺ eine Genhäufigkeit von 0,1452 berechnen.

Eine klinische Bedeutung konnte diesem Apo E-Phänotyp bisher nicht beigemessen werden. Aus der Tatsache, daß dieses Merkmal sowohl in der Normalbevölkerung als auch in einer hyperlipämischen Population in 27-28% in Erscheinung tritt, kann aber gefolgert werden, daß die Apo E-IV-Variante mit einer Form der Hyperlipidämie nicht verknüpft ist.

IV 7. Familienuntersuchung

Mit der Entdeckung der Apo E-III-Defizienz bei Individuen mit Hyperlipoproteinämie Typ III bestand zum ersten Mal die Möglichkeit, mit Hilfe eines spezifischen qualitativen Merkmals die Genetik dieser Fettstoffwechselstörung zu untersuchen.

Bei der hier beschriebenen 39 Mitglieder zählenden Familie handelt es sich um die Verwandtschaft der 65-jährigen Frau A.W., einer der 5 unter Marburger Blutspendern ermittelten Probanden mit dem Phänotyp Apo E-D (Tabelle 4). An biochemischen Untersuchungen wurden 1. die isoelektrische Fokussierung der durch Ultrazentrifugation und Heparin-Mg²⁺-Fällung isolierten Apo-VLDL, 2. die Lipidelektrophorese und 3. die Bestimmung von Cholesterin und Triglyceriden im Serum und in den VLDL durchgeführt.

In Abbildung 9 ist der Stammbaum der Familie von Frau A.W. (II-6) aufgezeichnet. Die Aufspaltung der Apo E-Phänotypen über 4 Generationen innerhalb dieser Familie stimmt mit einem autosomal kodominanten Erbgang überein, bei dem die 2 Allele Apo Eⁿ und Apo E^d die 3 Phänotypen Apo E-N, Apo E-ND und Apo E-D bedingen. Eine Analyse der Aufspaltung der Apo E-Phänotypen in dieser Familie ist in Tabelle 10 wiedergegeben: Alle 3 Kinder (III-10, III-12, III-14), die aus der Ehe der für das Allel Apo E^d homozygoten Frau A.W. (II-6) und ihres verstorbenen (daher nicht untersuchten) Ehemannes (II-5) stammen, zeigen ausschließlich den hetero-

Tabelle 10: Aufspaltung der Apo E-Phänotypen in der Familie A.W.

Eltern-Kombination			Anzahl der Ehen	Phänotypen der Kinder		
				Apo E-N	Apo E-ND	Apo E-D
N	x	ND	7	8	4	0
ND	x	ND	1	0	2	1
D	x	ver- stor.	1	0	3	1

zygoten Phänotyp Apo E-ND. Aus der Verbindung der heterozygoten Eheleute II-3 und II-4 sind 1 Kind (III-5) mit dem homozygoten Phänotyp Apo E-D und 2 Kinder (III-6, III-9) mit dem heterozygoten Phänotyp Apo E-ND hervorgegangen. In dieser Familie kommen insgesamt 7 Elternpaare vor, bei denen der eine Partner den Phänotyp Apo E-ND und der andere den Phänotyp Apo E-N aufweist. Ihre 12 Nachkommen besitzen in 4 Fällen den Phänotyp Apo E-ND und in 8 Fällen den Phänotyp Apo E-N. Die anhand dieser Familie erzielten Ergebnisse stehen in völligem Einklang mit den von UTERMANN und Mitarb. (53,56) durchgeführten umfangreichen Familienuntersuchungen, die ebenfalls einen autosomal kodominanten Vererbungsmodus für die Aufspaltung der Apo E-Phänotypen offenbarten.

In Tabelle 11 sind die Laborbefunde der Mitglieder der Familie A.W. zusammengestellt. Nicht für alle Probanden konnten die Untersuchungen vollständig durchgeführt werden, weil a) 5 Familienangehörige (I-3, I-4, I-5, I-6, II-5) bereits verstorben waren, b) von 4 Probanden (III-1, III-3, III-4, III-11) eine unzureichende Blutmenge durch den Hausarzt zugeschickt worden war und c) auf Wunsch der Eltern 6 Kindern (IV-1, IV-2, IV-3, IV-4, IV-5, IV-6) nur eine geringe Blutmenge entnommen werden durfte. Von allen lebenden Probanden konnten aber mit Hilfe der neuen Methode die Apo E-Phänotypen bestimmt werden.

Die normolipämischen Probanden II-6 und III-5 mit dem Phänotyp Apo E-D besaßen eine β -VLDL-Unterfraktion und erfüllten außerdem die für die HLP Typ III geforderten lipidchemischen Kriterien.

Unter 14 Probanden mit dem Phänotyp Apo E-ND, deren Seren auch mit der Ultrazentrifuge aufgearbeitet worden waren, befanden sich 3 Probanden (I-1, I-2, III-6) mit einer β -VLDL-Unterfraktion; zusätzlich deuteten auch die lipidchemischen Werte der Probanden I-1 und III-6 auf die Primäre Dysbetalipoproteinämie hin. Ein weiterer heterozygoter Proband (IV-7), der eine normale prä- β -VLDL aufwies, erfüllte das von

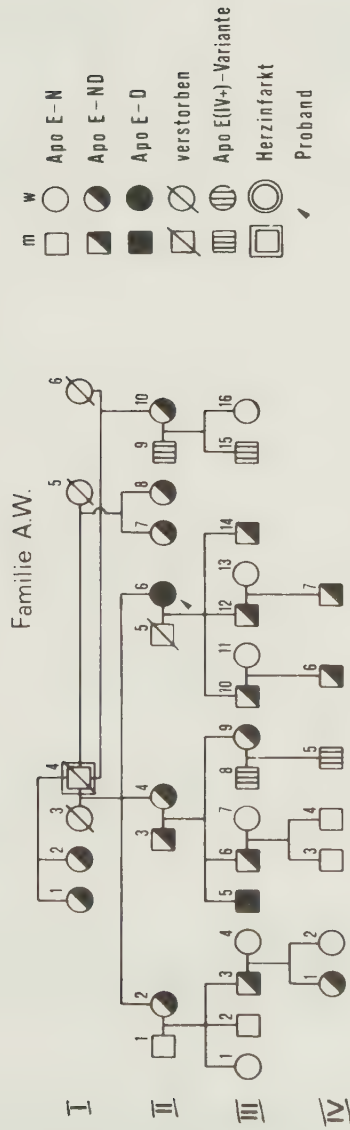


Abb. 9: Stammbaum der Familie A.W.

Tabelle 11: Laborbefunde der Mitglieder der Familie A.W. (Blatt 1)

Individuum	Alter Geschlecht	Serum Ch TG	VLDL Ch TG	VLDL Ch/TG	ChVLDL/ TG Serum	Elektropho- rese Typ	Apo E- Phänotyp
I- 1	80/w	203	51	18 34	0,53	0,35	β-VLDL
I- 2	74/w	166	56	10 29	0,34	0,18	β-VLDL
I- 3	35/w ⁺)	-	-	-	-	-	-
I- 4	79/m ⁺)	-	-	-	-	-	-
I- 5	44/w ⁺)	-	-	-	-	-	-
I- 6	43/w ⁺)	-	-	-	-	-	-
II- 1	76/m	195	115	22 97	0,23	0,19	prae β-VLDL
II- 2	68/w	200	122	22 62	0,35	0,18	prae β-VLDL
II- 3	71/m	179	89	17 42	0,40	0,19	prae β-VLDL
II- 4	67/w	221	109	18 68	0,26	0,17	prae β-VLDL
II- 5	54/m ⁺)	-	-	-	-	-	-
II- 6	65/w	190	118	34 60	0,57	0,29	β-VLDL
II- 7	56/w	201	71	8 29	0,28	0,11	prae β-VLDL
II- 8	54/w	244	170	17 97	0,18	0,10	prae β-VLDL
II- 9	50/m	202	259	36 106	0,34	0,14	prae β-VLDL
II-10	46/w	252	359	63 347	0,18	0,18	prae β-VLDL
III- 1	41/w	-	-	-	-	-	Apo E-N
III- 2	32/m	264	236	35 116	0,30	0,15	prae β-VLDL
III- 3	30/m	-	-	-	-	-	Apo E-ND

⁺) verstorben

Tabelle 11: Laborbefunde der Mitglieder der Familie A.W. (Blatt 2)

Individuum	Alter Geschlecht	Serum Ch TG	VLDL Ch TG	VLDL Ch/TG	Ch _{VLDL} /TG	Serum TG	Elektrophorese Typ	Apo E- Phänotyp
III-4	30/w	-	-	-	-	-	-	Apo E-N
III-5	44/m	183	52	74	0,70	0,33	β-VLDL	Apo E-D
III-6	36/m	162	24	26	0,92	0,44	β-VLDL	Apo E-ND
III-7	34/w	173	10	20	0,50	0,13	prae β-VLDL	Apo E-N
III-8	41/m	224	48	132	0,36	0,13	prae β-VLDL	Apo E-N/E-IV
III-9	34/w	185	19	58	0,33	0,17	prae β-VLDL	Apo E-ND
III-10	44/m	230	25	88	0,28	0,19	prae β-VLDL	Apo E-ND
III-11	41/w	203	-	-	-	-	-	Apo E-N
III-12	42/m	181	28	165	0,17	0,16	prae β-VLDL	Apo E-ND
III-13	37/w	247	15	58	0,26	0,11	prae β-VLDL	Apo E-N
III-14	38/m	203	35	111	0,32	0,15	prae β-VLDL	Apo E-ND
III-15	25/m	295	152	260	0,58	0,18	prae β-VLDL	Apo E-N/E-IV
III-16	20/w	193	5	18	0,28	0,09	prae β-VLDL	Apo E-N
IV-1	8/w	-	-	-	-	-	-	Apo E-ND
IV-2	7/w	-	-	-	-	-	-	Apo E-N
IV-3	11/m	164	-	-	-	-	-	Apo E-N
IV-4	6/m	175	-	-	-	-	-	Apo E-N
IV-5	7/m	236	-	-	-	-	-	Apo E-N/E-IV
IV-6	16/m	141	-	-	-	-	-	Apo E-ND
IV-7	15/m	219	15	24	0,63	0,18	prae β-VLDL	Apo E-ND

HAZZARD und Mitarb. (26) vorgeschlagene lipidchemische Kriterium. Die übrigen Probanden mit dem Phänotyp Apo E-ND boten keine Zeichen der Primären Dysbetalipoproteinämie.

Bei keinem der 8 Probanden mit dem Phänotyp Apo E-N, deren Seren auch mit der Ultrazentrifuge aufgearbeitet worden waren, konnte eine β -VLDL-Unterfraktion festgestellt werden. 2 dieser Probanden (III-7/III-15) besaßen jedoch ein Verhältnis von VLDL-Cholesterin zu Serum-Triglyceriden von mehr als 0,42.

Die oben aufgeführten Befunde zeigen also, daß Individuen mit dem Phänotyp Apo E-D die Charakteristika der Primären Dysbetalipoproteinämie aufweisen. Die Individuen mit den Phänotypen Apo E-N oder Apo E-ND hingegen erfüllen im allgemeinen die Kriterien dieser Fettstoffwechselstörung nicht. Aus dieser Beobachtung läßt sich folglich für die Primäre Dysbetalipoproteinämie ein autosomal rezessiver Erbgang ableiten. Wie am Beispiel der Probanden I-1, I-2 und III-6 deutlich wird, kann aber gelegentlich auch bei heterozygoten Individuen eine Dyslipoproteinämie auftreten - ein Phänomen, das dem "intermediären" Vererbungstyp entspricht.

V DISKUSSION

Die Vielfalt der zur Bestimmung der Hyperlipoproteinämie Typ III angebotenen Tests spiegelt die Schwierigkeiten bei der Diagnose dieser Fettstoffwechselstörung wieder. Ursprünglich wurde die HLP Typ III durch ein atypisches Lipoprotein definiert, das die elektrophoretische Mobilität von β -Lipoproteinen besitzt, aber zu der Fraktion der VLDL gehört (β -VLDL) (13). Die Diagnose gemäß dieser Definition erfordert die Ultrazentrifugation und bleibt daher auf wenige spezialisierte Laboratorien beschränkt. Aus diesem Grund wurde in der Vergangenheit mehrmals versucht, solche Methoden zur Aufdeckung der HLP Typ III zu entwickeln, die der Ultrazentrifugation nicht bedürfen. Im Prinzip beruhen die meisten dieser Tests auf der Darstellung der β -VLDL im Serum. Immunologische Methoden (48), die spezifische Fällung der Lipoproteine nach ihrer Trennung in der Agarosegel-Elektrophorese (61), die analytische isoelektrische Fokussierung nativer Lipoproteine (18) und die Gelfiltration (49) wurden zu diesem Zweck verwendet. In letzter Zeit wurde jedoch wiederholt gezeigt, daß die "floating- β "-Lipoproteine nicht pathognomonisch für die HLP Typ III sind. Bei den β -VLDL soll es sich vielmehr um ein physiologisches Zwischenprodukt im normalen VLDL-Katabolismus handeln (3,24,25,28,30). Außerdem wurden in der Agarosegel-Elektrophorese häufig zusätzliche prä- β -Banden (slow- oder late-prä- β) in den VLDL beobachtet, deren Unterscheidung von einer β -VLDL-Bande in vielen Fällen rein willkürlich getroffen wurde (6,57). Folglich müssen alle Methoden zur Diagnose der HLP Typ III ohne Ultrazentrifugation, die ausschließlich auf dem Nachweis des β -VLDL-Merkmals beruhen, als unspezifisch angesehen werden. Auch der von MASKET und Mitarb. (36) vorgeschlagene Vergleich der Ergebnisse von Papier-Elektrophorese und diskontinuierlicher Polyacrylamidgel-Elektrophorese des Serums soll gemäß neuen Untersuchungen (1) nicht zur Diagnose der HLP Typ III geeignet sein. Wegen dieser unbefriedigenden Ergebnisse wurden während der vergangenen Jahre von verschiedenen Gruppen An-

strengungen gemacht, die HLP Typ III durch lipidchemische Kriterien zu definieren (15,26,39,57). Hierzu wurde aber wiederum die Ultrazentrifugation benötigt.

Bei anfänglich 15 Patienten mit Hyperlipoproteinämie Typ III beobachteten UTERMANN und Mitarb. (51,55) mit Hilfe der analytischen isoelektrischen Fokussierung der harnstofflöslichen Apo-VLDL und Apo-LDL-1 ein abweichendes Muster des polymorphen Apoproteins E mit einer fehlenden Apo E-III-Bande. Die hier vorgestellte kombinierte Fällungs- und Fokussierungsmethode ist das erste Verfahren, welches ein spezifisches qualitatives Merkmal zur Diagnose der HLP Typ III ohne Ultrazentrifugation benutzt. Das Verfahren beruht auf dem Nachweis der Apo E-III-Defizienz in den VLDL. Die zur Isolierung der VLDL bisher erforderliche Ultrazentrifugation wird bei der neuen Methode durch die Fällung der VLDL aus dem Serum abgelöst. Die Fällungsmethode bietet gegenüber der Ultrazentrifugation bei einer ebensogroßen Zuverlässigkeit mehrere entscheidende Vorteile: Zur Fällung der VLDL reicht eine Menge von 1 ml Serum aus, zur Ultrazentrifugation hingegen werden mehrere ml Serum benötigt; die Fällung ist in weniger als 2 1/2 Stunden abgeschlossen, während der Zeitaufwand für die Ultrazentrifugation etwa 48 Stunden beträgt; die Fällung ist ein einfaches und billiges, daher zur klinischen Routinediagnostik und zum Screening geeignetes Verfahren, wohingegen die Ultrazentrifugation als eine aufwendige und teure Technik Speziallaboratorien vorbehalten ist.

Mit allen früher zur Diagnose der HLP Typ III vorgeschlagenen Methoden konnten nur solche Individuen untersucht werden, die zuvor wenigstens 12 Stunden lang gefastet hatten. Die Darstellung des abweichenden Apo E-Musters hingegen ist von unterschiedlichen metabolischen Bedingungen unabhängig und sogar postprandial möglich. Eine Nüchternblutentnahme wie bei den herkömmlichen Verfahren ist also nicht notwendig, was das Screening nach dieser Fettstoffwechselstörung erheblich erleichtert.

Unter 227 hyperlipämischen Kontrollen wurde durch Screening mit Hilfe der neuen Methode bei 4 Patienten der Apo E-III-Defekt nachgewiesen. Nur bei einem dieser 4 Patienten war die Hyperlipoproteinämie Typ III schon vorher bekannt gewesen; bei den übrigen 3 Patienten war diese Diagnose bisher noch nicht gestellt worden. Die Entdeckung dieser Patienten ist ein erneuter Beweis für die große Spezifität des Apo E-Merkmals. Gemäß den lipidchemischen Kriterien durften 2 dieser 4 Patienten nur als "mögliche Typ III-Patienten" eingestuft werden. Der Vergleich mit dem genetisch bestimmten Apo E-Merkmal zeigt also, daß auch die quantitativen lipidchemischen Kriterien nicht geeignet sind, alle Patienten mit HLP Typ III zuverlässig zu erfassen, da offenbar die phänotypische Expressivität des Apo E-III-Defektes größeren Schwankungen unterliegt.

Über die Erfassung der für die Hyperlipoproteinämie Typ III heterozygoten Individuen sollte die Genhäufigkeit dieser als sehr selten eingeschätzten Fettstoffwechselstörung (29,39) in der Normalbevölkerung bestimmt werden. Zu diesem Zweck wurden mittels der neuen Methode die verschiedenen Apo E-Phänotypen (1. das normale Apo E-Muster, 2. das für heterozygote Individuen typische intermediäre Apo E-Muster, 3. das Muster der Apo E-III-Defizienz) in einer Marburger Bevölkerungsstichprobe ermittelt. Überraschenderweise wurden in 1% das Muster der Apo E-III-Defizienz, in 15,7% das intermediäre Apo E-Muster und nur in 83,3% das normale Apo E-Muster gefunden. Alters- oder Geschlechtsunterschiede in der Häufigkeitsverteilung der Apo E-Phänotypen traten nicht auf. Diese Daten und die Ergebnisse umfangreicher Familienuntersuchungen (53,56) zeigen, daß das Apoprotein E einen genetischen Polymorphismus aufweist, bei dem die 3 Phänotypen Apo E-N, Apo E-ND und Apo E-D durch die 2 Allele Apo Eⁿ und Apo E^d bestimmt werden. Für das Allel Apo E^d läßt sich nach diesen Daten eine Genhäufigkeit von 0,0888 in der Bevölkerung berechnen.

Da in früheren Untersuchungen (55) alle für das Allel Apo E^d

homozygoten Individuen an Hyperlipoproteinämie Typ III erkrankt waren und da außerdem diese Fettstoffwechselstörung als eine sehr seltene Erkrankung angesehen wurde (29,39), war die Häufigkeit des Allels Apo E^d mit 0,0888 unerwartet groß. Deshalb sollte geklärt werden, ob auch die 5 in der Marburger Bevölkerungsstichprobe entdeckten Probanden mit dem Phänotyp Apo E-D typische Zeichen der HLP Typ III besaßen. Aufgrund der Ergebnisse biochemischer Untersuchungen stellten diese 5 Probanden eine gesonderte Gruppe mit Abnormalitäten in ihrem Lipoproteinspektrum dar, wie sie für die HLP Typ III charakteristisch sind. Keiner der 5 Probanden wies jedoch eine Hypercholesterinämie auf, bei den 3 noch nicht 30-jährigen Probanden wurde sogar eine Hypocholesterinämie festgestellt. Nur 3 Probanden zeigten eine leichte Hypertriglyceridämie. Wegen dieser Befunde scheint der von HAVEL (23) vorgeschlagene Ausdruck "Primäre Dysbetalipoproteinämie" diese Fettstoffwechselstörung am besten zu charakterisieren. Im Gegensatz zu der großen Häufigkeit der Primären Dysbetalipoproteinämie in der Bevölkerung scheinen jedoch Individuen mit dem Phänotyp Apo E-D, die gleichzeitig eine schwere Hyperlipidämie, Xanthomatose und frühzeitige Arteriosklerose aufweisen, selten zu sein. Hierfür sind grundsätzlich 2 Erklärungen möglich: Entweder tritt bei Individuen mit dem Phänotyp Apo E-D eine Hyperlipidämie nur gelegentlich als dekompenzierter Zustand infolge ungünstiger exogener Bedingungen auf, oder zusätzliche Mutanten für andere Formen der familiären Dyslipoproteinämie sind für die Hyperlipidämie bei diesen Individuen verantwortlich. In diesem Zusammenhang ist die Frage von Interesse, ob Individuen mit dem Phänotyp Apo E-D, die zwar eine Dys- aber keine Hyperlipoproteinämie zeigen, auch gefährdet sind, frühzeitig eine Arteriosklerose zu entwickeln.

Mit dem Nachweis der Apo E-Phänotypen war zum ersten Mal die Möglichkeit gegeben, mit einem spezifischen qualitativen Merkmal die Genetik der Primären Dysbetalipoproteinämie zu erforschen. Die Aufspaltung der Apo E-Phänotypen in der

Familie A.W. und anderen von UTERMANN und Mitarb. (53,56) untersuchten Familien stimmt mit einem autosomal kodominanten Erbgang überein, bei dem die 2 Allele Apo Eⁿ und Apo E^d die 3 Phänotypen Apo E-N, Apo E-ND und Apo E-D bedingen. Zeichen der Primären Dysbetalipoproteinämie tragen im allgemeinen nur die für diese Fettstoffwechselstörung homozygoten Individuen mit dem Phänotyp Apo E-D, nicht aber die Individuen mit dem Phänotyp Apo E-ND oder Apo E-N. Folglich läßt sich für die Primäre Dysbetalipoproteinämie ein autosomal rezessiver Vererbungsmodus ableiten. In der Literatur hingegen wurde für die Hyperlipoproteinämie Typ III wiederholt ein autosomal dominanter Vererbungsmodus angegeben (14,29,40,41); allerdings wurde in jenen Studien die Diagnose mit den herkömmlichen klassischen Methoden gestellt. In der Familie A.W. wiesen auch 3 Probanden mit dem heterozygoten Phänotyp Apo E-ND eine β -VLDL-Unterfraktion auf und 2 dieser 3 Probanden erfüllten zusätzlich die für die HLP Typ III geforderten lipidchemischen Kriterien. Diese Ergebnisse zeigen, daß mit den klassischen Methoden hetero- und homozygote Individuen der Primären Dysbetalipoproteinämie nicht immer sicher differenziert werden können, daß diese Unterscheidung aber zuverlässig über die Darstellung des Apo E-Phänotyps getroffen werden kann. Es ist denkbar, daß in dieser Schwäche der klassischen Methoden einer der Gründe zu suchen ist, die zur Hypothese eines autosomal dominanten Erbganges der HLP Typ III geführt haben. Da aber eine Dyslipoproteinämie nicht nur bei allen homozygoten Individuen mit dem Phänotyp Apo E-D auftritt, sondern gelegentlich, wie im Fall der Familie A.W., auch bei heterozygoten Individuen mit dem Phänotyp Apo E-ND ausgeprägt sein kann, muß für die Primäre Dysbetalipoproteinämie korrekterweise also ein sog. autosomal "intermediärer" Vererbungsmodus angenommen werden.

In Familien mit Primärer Dysbetalipoproteinämie (53,56) wurde häufig eine vertikale Übertragung dieser Fettstoffwechselstörung beobachtet. Dieses Phänomen läßt sich am leichtesten als Pseudodominanz erklären, da wegen der großen

Häufigkeit des heterozygoten Phänotyps Apo E-ND von 15,7% und des homozygoten Phänotyps Apo E-D von 1% in der Normalbevölkerung ein Individuum mit dem Phänotyp Apo E-D in 8,85% Nachkommen mit dem gleichen Phänotyp Apo E-D zu erwarten hat.

In der hyperlipämischen Population kommt das Allel Apo E^d signifikant häufiger ($p < 0,002$) vor als in der Normalbevölkerung. Dieser deutliche Unterschied resultiert aber nicht nur aus der relativ größeren Anzahl der Typ III-Patienten in dem hyperlipämischen Patientengut, auch die Häufigkeit der heterozygoten Probanden allein ist signifikant größer ($p < 0,003$) als in der Normalbevölkerung. Möglicherweise sind also die Genträger der Primären Dysbetalipoproteinämie besonders disponiert, eine Hyperlipidämie zu entwickeln; es ist auch möglich, daß sich bei diesen Individuen durch die Wirkung zusätzlicher Mutanten eher eine Hyperlipidämie ausprägt.

Ein weiterer Apo E-Phänotyp, der durch die Gegenwart einer zusätzlichen kathodischen Apo E-Bande (+E-IV-Variante) gekennzeichnet ist, wurde in 27-28% in der Normalbevölkerung und in der hyperlipämischen Population gefunden. Familienuntersuchungen (54) zeigten, daß diese +E-IV-Variante autosomal dominant vererbt wird und daß sie unabhängig vom Apo E-II/E-III-Polymorphismus ist. Die +E-IV-Variante unterliegt also einem genetischen Polymorphismus, bei dem die 2 Phänotypen, die durch die Gegenwart oder das Fehlen der Apo E-IV-Bande charakterisiert sind, durch die 2 Allele Apo E-IV⁺ und Apo E-IV⁻ bestimmt werden. Eine klinische Bedeutung konnte der +E-IV-Variante bisher nicht beigemessen werden; als Merkmal einer Hyperlipidämie dürfte sie wegen ihrer gleichgroßen Häufigkeit in der Normalbevölkerung und in der hyperlipämischen Population jedenfalls nicht zu werten sein.

VI ZUSAMMENFASSUNG

Patienten mit Hyperlipoproteinämie Typ III zeigen ein genetisch bestimmtes, abweichendes Fokussierungsmuster des Apolipoproteins E, einer der Hauptkomponenten der VLDL (51,55). Beruhend auf dem Nachweis des Apo E-Merkmals wurde ein spezifischer Test ohne Ultrazentrifugation zur Diagnose der HLP Typ III entwickelt. Der Test vereinigt die Heparin-Mg²⁺-Fällung der VLDL aus nur 1 ml Serum, die Lipidextraktion und die isoelektrische Fokussierung der harnstofflöslichen Apo-VLDL in einem einfachen und schnellen Verfahren. Die nach Heparin-Mg²⁺-Fällung der VLDL erhaltenen Apo E-Fokussierungsmuster sind identisch mit denjenigen, bei denen die VLDL durch Ultrazentrifugation isoliert wurden. Die Apo E-Muster bleiben unter unterschiedlichen metabolischen Bedingungen stabil und sind sogar postprandial nachweisbar. Wie ein Screening-Programm unter 227 hyperlipämischen Patienten beweist, können Individuen mit Zeichen der HLP Typ III mit Hilfe der neuen Methode selektiv erkannt werden.

Familienuntersuchungen (53,56) und die Häufigkeitsverteilung der Apo E-Muster unter 490 Blutspendern zeigen, daß das Apolipoprotein E einen genetisch bestimmten Polymorphismus aufweist. Die 3 Phänotypen Apo E-N (normales Apo E-Muster), Apo E-ND (intermediäres Apo E-Muster) und Apo E-D (Apo E-III-Defizienz) werden durch die 2 autosomalen Allele Apo Eⁿ (~ 0,91) und Apo E^d (~ 0,09) bedingt. Alle 5 Probanden mit dem Phänotyp Apo E-D, welche unter den Blutspendern entdeckt wurden, besaßen typische Zeichen der HLP Typ III mit einer β -VLDL-Unterfraktion und nur geringen Mengen an LDL-2, jedoch keine Hypercholesterinämie. Die hier vorliegende Fettstoffwechselstörung wird folglich durch den von HAVEL (23) vorgeschlagenen Ausdruck "Primäre Dysbetalipoproteinämie" am besten charakterisiert. Entweder tritt eine Hyperlipidämie bei Individuen mit dem Phänotyp Apo E-D nur gelegentlich als dekomensierter Zustand infolge ungünstiger exogener Bedingungen auf, oder zusätzliche Mutanten für andere Formen der familiären

Dyslipoproteinämie sind für die Ausprägung der Hyperlipidämie bei diesen Individuen verantwortlich.

Die Ergebnisse einer Familienuntersuchung, bei der die HLP Typ III sowohl mittels Darstellung der Apo E-Fokussierungsmuster als auch mit Hilfe der herkömmlichen Methoden diagnostiziert wurde, zeigen, daß die Apo E-Phänotypen autosomal kodominant und die Primäre Dysbetalipoproteinämie autosomal rezessiv vererbt werden.

In einem hyperlipämischen Patientengut wurde eine signifikant größere Häufigkeit des Allels Apo E^d ($p < 0,002$) ermittelt als in der Normalbevölkerung. Auch nur die Individuen mit dem heterozygoten Phänotyp Apo E-ND kamen in der hyperlipämischen Population signifikant häufiger ($p < 0,003$) vor. Die Genträger der Primären Dysbetalipoproteinämie scheinen also für die Entwicklung einer Hyperlipidämie besonders disponiert zu sein.

Durch isoelektrische Fokussierung wurde ein weiterer genetischer Polymorphismus des Apoproteins E beim Menschen entdeckt (54). Die 2 Phänotypen Apo E-IV(+) und Apo E-IV(-), die durch die Gegenwart oder das Fehlen einer zusätzlichen kathodischen Apo E-IV-Bande gekennzeichnet sind, werden durch die 2 autosomalen Allele Apo E-IV⁺ und Apo E-IV⁻ bestimmt. Die Apo E-IV-Variante ist in 26,9% in der Bevölkerung nachweisbar und mit einer Hyperlipidämie nicht verknüpft.

VI SCHRIFTTUMSVERZEICHNIS

1. ALBERS, J.J., WARNICK, G.R., HAZZARD, W.R.:
Type III Hyperlipoproteinemia: A Comparative Study
of Current Diagnostic Techniques
Clin. Chim. Acta (in Druck).
2. BEAUMENT, J.L, CARLSON, L.A., COOPER, G.R.,
FEJFAR, Z., FREDRICKSON, D.S., STRASSER, T.:
Classification of hyperlipidemias and hyperlipoprotein-
emias.
Wld Hlth Org. Bull. 43 (1970), 891-908
3. BILHEIMER, D.W., EISENBERG, S., LEVY, R.I.:
Abnormal metabolism of very low density Lipoproteins
(VLDL) in type III hyperlipoproteinemia (type III).
Circulation 44 (1971), II-56.
4. BORRIS, P.:
Type III hyperlipoproteinemia.
Brit. Med. J. 1969/2, 665-667.
5. BURSTEIN, M., SCHOLNICK, H.R.:
Lipoprotein-Polyanion-Metal Interactions.
Advanc. Lipid Res. 11 (1973), 67-108.
6. CARLSON, K., CARLSON, L.A.:
Comparison of the Behaviour of Very Low Density Lipo-
proteins of Type III Hyperlipoproteinaemia on Electro-
phoresis on Paper and on Agarose Gel with a Note on a
Late (Slow) Pre- β VLDL Lipoprotein.
Scand. J. clin. Lab. Invest. 4 (1975), 655-660.
7. EISENBERG, S., BILHEIMER, D.W., LEVY, R.I.,
LINDGREN, F.T.:
On the metabolic conversion of human plasma very low
density lipoproteins to low density lipoprotein.
Biochem. Biophys. Acta 326 (1973), 361-377.
8. EISENBERG, S., RACHMILEWITZ, D.:
Interaction of rat plasma very low density lipoprotein
with lipoprotein lipase-rich (postheparin) plasma.
J. Lipid Res. 16 (1975), 341-351.
9. EISENBERG, S.:
Lipoprotein metabolism and hyperliemia.
In: Atherosclerosis Review, ed. by R. Paoletti and A.M.
Gotto, Vol. 1, Raven Press, New York (1976), 23-60.
10. FREDRICKSON, D.S., LEES, R.S.:
A system for phenotyping hyperlipoproteinemia.
Circulation 31 (1965), 321.
11. FREDRICKSON, D.S., LEES, S.:
Familial hyperlipoproteinaemia.
In: Stanbury, Wyngaarden, Fredrickson, eds.,
The metabolic basis of inherited disease.
New York: McGraw-Hill (1966), 429.

12. FREDRICKSON, D.S., LEVY, R.I., LEES, R.S.:
Fat transport in lipoproteins- an integrated approach
to mechanisms and disorders.
New Eng. J. Med. 276 (1967) 32,94,148,215,273.
13. FREDRICKSON, D.S., LEVY, R.I., LINDGREN, F.T.:
A comparison of heritable abnormal lipoprotein patterns
as defined by two different techniques.
J. Clin. Invest. 47 (1968), 2446-2457.
14. FREDRICKSON, D.S., LEVY, R.I.:
Familial hyperlipoproteinemia. In: Stanbury, J.B.,
J.B. Wyngaarden, D.S. Fredrickson (Ed.): The Meta-
bolic Basis of Inherited Disease
(McGraw-Hill: New York 1972), 545-614.
15. FREDRICKSON, D.S., MORGANROTH, J., LEVY, R.I.:
Type III hyperlipoproteinemia: An analysis of two
contemporary definitions.
Ann. Intern. Med. 82 (1975), 150-157.
16. GLUECK, C.J., FALLAT, R.W., MELLIES, M.J. and STEINER,
P.M.:
Pediatric familial Type III hyperlipoproteinemia.
Metabolism, Vol. 25, No. 11 (1976), 1269-1274.
17. GODOLPHIN, W.J., CONRADI, G., CAMPBELL, D.J.:
Type III hyperlipoproteinaemia in a child.
Lancet 1972/I, 209-210.
18. GODOLPHIN, W.J., STINSON, R.A.:
Isoelectrofocusing of human plasma lipoproteins in
polyacrylamide gels: Diagnosis of type III hyperlipopro-
teinemia ("broad beta" disease).
Clin. Chim. Acta, 56 (1974), 97-103.
19. GOFMAN, J.W., DE LALLA, O., GLAZIER, F., FREEMAN, N.K.,
LINDGREN, F.T., STRISOWER, A.V., TAMPLIN, A.R.:
The serum lipoprotein transport system in health,
metabolic disorders, atherosclerosis and coronary
artery disease.
Plasma (Milan) 2 (1954), 413.
20. GRETEN, H., SEIDEL, D., WALTER, B., KOLBE, J.:
Die Lipoproteinelektrophorese zur Diagnose von Hyper-
lipoproteinämien.
Dtsch. med. Wschr. 95 (1970), 1716.
21. HAMILTON, R.L., KAYDEN, H.J.:
The liver and the formation of normal and abnormal plas-
ma lipoproteins.
In: The biologic chemistry of disease, Vol. 5:
The liver: Normal and abnormal function (Part A);
Marcel Dekker, New York (1974), 532-572.
22. HAVEL, R.I., EDER, H.A. and BRAGDON, I.H.:
The distribution and chemical composition of ultracen-
trifugally separated lipoproteins in human serum.
J. Clin. Invest. 34 (1955), 1345-1353.

23. HAVEL, R.J.:
Mechanisms of hyperlipoproteinemia.
Advan. Med. Biol. 26 (1972), 57-70.
24. HAVEL, J.R., KANE, J.P.:
Primary dysbeta-lipoproteinemia: predominance of a specific apoprotein species in triglyceride-rich lipoproteins.
Proc.Nat.Acad.Sci. (Wash.) 70 (1973), 2015-2019.
25. HAZZARD, W.R., BIERMAN, E.L.:
Impaired removal of very low density lipoprotein (VLDL) "remnants" in the pathogenesis of broad-beta disease (type III hyperlipoproteinemia).
Clin.Res. 19 (1971), 476.
26. HAZZARD, W.R., PORTE, D. jr. and BIERMAN, E.L.:
Abnormal lipid composition of very low density lipoproteins in diagnosis of broad-beta disease (type III hyperlipoproteinemia).
Metabolism 21 (1972), 1009-1019.
27. HAZZARD, W.R., GOLDSTEIN, J.L., SCHROTT, H.G., MOTULSKY, A.G., BIERMAN, E.L.:
Hyperlipidemia in coronary heart disease III: Evaluation of lipoprotein phenotypes of 156 genetically defined survivors of myocardial infarction.
J. Clin.Invest. 52 (1973), 1569-1577.
28. HAZZARD, W.R., BIERMAN, E.L.:
The spectrum of electrophoretic mobility of very low density lipoproteins: Role of slower migrating species in endogenous hypertriglyceridemia (type IV hyperlipoproteinemia) and Broad- β Disease (type III).
J. Lab.Clin.Med. 86 (1975), 239-252.
29. HAZZARD, W.R., O'DONNELL, T.F., LEE, Y.L.:
Broad-beta disease (type III hyperlipoproteinemia) in a large kindred. Evidence for a monogenic mechanism.
Ann. Int. Med. 82 (1975), 141-149.
30. HAZZARD, W.R., BIERMAN, E.L.:
Delayed clearance of chylomicron remnants following Vitamin-A-containing oral fat loads in Broad- β disease (type III hyperlipoproteinemia).
Metabolism 25 (1976), 777-801.
31. HESSEL, L.W., VERMEER, B.J., POLANO, M.K., DE JONGE, H., DE PAGTER, H.A.Th., VAN GENT, C.M.:
Primary hyperlipoproteinemia in xanthomatosis.
Clinica Chimica acta, 69 (1976), 405-416.
32. KLEMENS, U.H., LÖWIS OF MENAR, P.I. von, BREMER, A., WNUCK, I.V., SCHRÖDER, R.:
Hyperlipoproteinämie und Coronarerkrankungen.
Klin. Wschr. 50 (1972), 139.

33. KOSTNER, G., HOLASEK, A.:
Characterization and quantitation of the apolipoproteins from human chyle chylomicrons.
Biochemistry, 11 (1972), 1217-1223.
34. KWITEROVICH, P.O., NEILL, C., MARGOLIS, S., THAMER, M., BACHORIK, P.:
Allelism, non-allelism and genetic compounds in familial hyperlipoproteinemia.
Clin. Res. 23 (1975), 262 A.
35. LEE, D.M., ALAUPOVIC, P.:
Physicochemical properties of low-density lipoproteins of normal human plasma: Evidence for the occurrence of lipoprotein B in associated and free forms.
Biochem. J., 137: 155-167.
36. MASKET, B.H., LEVY, R.I. and FREDRICKSON, D.S.:
The use of polyacrylamide gel electrophoresis in differentiating Type III hyperlipoproteinemia.
J. Lab. Clin. Med. 81 (1973), 794-802.
37. VAN MELSEN, A., DE GREVE, Y., VANDERVEIKEN, F., VASTESAEGER, M., BLATON, V., PEETERS, H.:
A modified method for phenotyping of hyperlipoproteinemia on agarose electrophoresis.
Clin. Chem. Acta 55 (1974), 225-234.
38. MISHKEL, M.A.:
Type III hyperlipoproteinemia with xanthomatosis.
In: Peeters, H. (Ed.): Protides of the Biological Fluids (Pergamon Press: New York (1971), 283-287.
39. MISHKEL, M.A., NAZIR, D.J., CROWTHER, S.:
A longitudinal assessment of lipid ratios in the diagnosis of type III hyperlipoproteinaemia.
Clin. Chim. Acta 58 (1975), 121-136.
40. MORGANROTH, J., LEVY, R.I. and FREDRICKSON, D.S.:
The biochemical, clinical and genetic features of Type III hyperlipoproteinemia.
Ann. intern. Med. 82 (1975), 158-174.
41. MOSER, H., SLACK, J., BORRIE, P.:
Type III hyperlipoproteinemia: a genetic study with an account of the risks of coronary death in first degree relatives (abstract 125).
III. International Symposium on Atherosclerosis, West Berlin, Germany, October 24-28 (1973).
42. PATSCH, J.R., PATSCH, W., SAILER, S., BRAUNSTEINER, H.:
Familiäre Hyperlipoproteinämie Typ III.
Dtsch. med. Wschr. 101 (1976), 1612-1619.
43. POLANO, M.K., BAES, H., HULSMANS, A.M., QUERIDO, A., PRIES, C., VAN GENT, C.M.:
Xanthomata in primary hyperlipoproteinemia.
Arch. Dermatol. 100 (1969), 387-398.

44. QUARFORDT, S., LEVY, R.I., FREDRICKSON, D.S.:
On the lipoprotein abnormality in type III hyperlipoproteinemia.
J. Clin. Invest. 50 (1971), 754-761.
45. RÖSCHLAU, P., BERNT, E., GRUBER, W.:
Enzymatische Bestimmung des Gesamt-Cholesterins im Serum.
Z. klin.Chem.klin.Biochem. 12 (1974), 226 und 403.
46. SCHNEIDER, J., MAURER, M. und KAFFARNIK, H.:
Häufigkeit der Hyperlipoproteinämie Typ III bei elektrophoretisch nachweisbarer breiter beta-Bande.
Klin. Wschr. 52 (1974), 941-942.
47. SEIDEL, D., ALAUPOVIC, P., FURMAN, R.H.:
A lipoprotein characterizing obstructive jaundice. I. Method for quantitative separation and identification of lipoproteins in jaundiced subjects.
J.Clin.Invest. 48 (1969), 1211.
48. SEIDEL, D., GRETEN, H:
Hyperlipoproteinämie-Typ III: Eine Möglichkeit zur immunologischen Diagnostik.
Clin. Chim. Acta, 30 (1970), 31-36.
49. SHEPHERD, J., PACKARD, C.J., DRYBURGH, F.J., Third, J.L.H.C.:
Diagnosis of Type III hyperlipoproteinemia by chromatography of plasma lipoproteins on columns containing agarose.
Clin.Chem. 21, No. 13 (1975), 1887-1891.
50. SHORE, V.G., SHORE, B.:
Heterogeneity of human plasma very low density lipoproteins: Separation of species differing in protein components.
Biochemistry 12 (1973), 502-507.
51. UTERMANN, G., JÄSCHKE, M and MENZEL, J.:
Familial hyperlipoproteinemia type III: Deficiency of a specific apolipoprotein (Apo E-III) in the very low density lipoproteins.
FEBS Letters 56 (1975), 352-355.
52. UTERMANN, G., HEES, M., VOGELBERG, K.H.:
Broad- β Disease (Hyperlipoproteinaemia Type III): Genetics, Gene Frequency and Diagnosis Without Ultracentrifugation.
Electrofocusing and Isotachopheresis, Ed.: B.J. Radola, D. Graesslin, Walter de Gruyter. (1977), 281-293.
53. UTERMANN, G., CANZLER, H., HEES, M., JÄSCHKE, M., MÜHLFELLNER, G., STEINMETZ, A., VOGELBERG, K.H.:
Genetics of Broad- β Disease (Hyperlipoproteinaemia Typ III)
in: Protides of the Biological Fluids, XXV Colloquium, Brügge, May 1977, H. Peeters Ed., Pergamon Press, in Druck.

54. UTERMANN, G., BEISIEGEL, U., HEES, M., MÜHLFELLNER, G.,
PRUIN, N., STEINMETZ, A.:
A Further Genetic Polymorphism of Apolipoprotein E
From Human Very Low Density Lipoproteins.
in: *Protides of the Biological Fluids*, XXV Colloquium,
Brügge, May 1977, H. Peeters Ed., Pergamon Press, in
Druck.
55. UTERMANN, G., CANZLER, H., HEES, M., JAESCHKE, M.,
MÜHLFELLNER, G., SCHOENBORN, W., VOGELBERG, K.H.:
Studies on the Metabolic Defect in Broad- β Disease
(hyperlipoproteinaemia Type III).
Clinical Genetics: in Druck
56. UTERMANN, G., HEES, M., STEINMETZ, A.:
A polymorphism of Apolipoprotein E and occurrence of
Dysbetalipoproteinaemia in man.
Nature (1977), zur Publikation eingereicht.
57. VESSBY, B.:
Studies on the serum lipoprotein composition in
50-year-old men. Suggestion of chemical criteria for
diagnosis of hyperlipoproteinaemia type III (broad- β
disease).
Clin.Chim. Acta 69 (1976), 891-908.
58. WAHLEFELD, A.W.:
in H.U. Bergmeyer: *Methoden der enzymatischen Analy-
se*, 3. Auflage Bd. II, Verlag Chemie, Weinheim 1974,
S. 1878.
59. WEBER, K., BRAUN-FALCO, O.:
Die Hyperlipoproteinämie vom Typ III:
Der Hautarzt 24 (1973), 179-185.
60. WIELAND, H., SEIDEL, D.:
Plasmalipoproteine bei Patienten mit Hyperthyreose:
Isolierung und Charakterisierung eines abnormen
High-Density-Lipoproteins.
Z. Klin. Chem. Biochem. 10 (1972), 311-321.
61. WIELAND, H., SEIDEL, D.:
Improved techniques for assessment of serum lipopro-
tein patterns. II. Rapid method for diagnosis of type
III hyperlipoproteinemia without ultracentrifugation.
Clin.Chem. 19/10 (1973), 1139-1141.

LEBENS LAUF

Ich wurde als zweites Kind des Arztes Dr. med. Josef Hees und seiner Ehefrau Ursula Hees, geb. Korn am 9.9.1948 in Rothemühle geboren.

Von 1955 bis 1959 besuchte ich die Volksschule in Heid. 1959 wechselte ich auf das Städt. Gymnasium in Siegen, wo ich im Juli 1967 die Reifeprüfung ablegte. Anschließend begann ich in Marburg das Studium der Humanmedizin, welches ich im Juli 1975 mit dem Staatsexamen abschloß.

Die Medizinalassistentenzeit leistete ich von September 1975 bis August 1976 an Marburger Universitätskliniken ab. Nach Erteilung der Approbation arbeitete ich vorübergehend in der Klinik für Kinder- und Jugendpsychiatrie in Marburg. Seit Juli 1977 bin ich als Assistenzarzt bei Herrn Prof. Ullerich in der Augenklinik der Städt. Krankenanstalten in Dortmund beschäftigt.

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Herren
Professoren und Dozenten:

Amon, Berendes, Bommer, Braasch, Brück, Buchholz, Daume,
Dimroth, Dittrich, Dölle, Exner, Friederich, Ganz,
Golenhofen, Graul, Hamelmann, Hardewig, Heene, Hensel,
Hess, Heuser, Hilgermann, Hort, Jacob, Karlson, Koecke,
Koransky, Korb, Kühnel, Linneweh, Maroske, Martini,
Neurath, Nöth, Nultsch, Petry, Pots, Reim, Rodeck, Rohen,
Schiff, Schmidts-Moormann, Seidel, Siegert, Solcher,
Straub, Stuke, Uhlarik, Walcher, Willenbockel.

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die der Medizinischen Fakultät Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

"Primäre Dysbetalipoproteinämie: Diagnose ohne Ultrazentrifugation, Genhäufigkeit, Genetik"

im Institut für Humangenetik der Universität Marburg unter Leitung von Herrn Prof. Dr. G. G. Wendt mit Unterstützung durch Herrn Dr. med. habil. G. Utermann ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- und ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Marburg

(Michael Hees)

City Schnelldruck, Marcusstraße 10, 8700 Würzburg